



Entwicklung und Anwendung eines neuen murinen intestinalen *in vitro* Testsystems

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Theresa Truschel
aus Berlin - Mitte

1. Referent:	Prof. Dr. Michael Steinert
2. Referentin:	Prof. Dr. Theresia Stradal
eingereicht am:	11.12.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	22.01.2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Horstmann JA, Zschieschang E*, **Truschel T***, de Diego J, Lunelli M, Rohde M, May T, Strowig T, Stradal T, Kolbe M & Erhardt M (2017). Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive salmonella gut colonization. *Cell Microbiol* **19**.

*Gleichermaßen beigetragen

Lipps C, Klein F, Wahlicht T, Seiffert V, Butueva M, Zauers J, **Truschel T**, Luckner M, Koester M, MacLeod R, Petzold J, Huehn J, Yuan Q, Müller PP, Kempf H, Zweigerdt R, Dittrich-Breiholz O, Pufe T, Beckmann R, Drescher W, Riancho J, Sanudo C, Korff T, Opalka B, Rebmann V, Göthert JR, Alves PM, Ott M, Schucht R, Hauser H, Wirth D & May T (2017). Expansion of functional, personalized cells with specific transgene combinations. *Nature* (in Revision).

Tagungsbeiträge

May T, Schucht R, **Herfurth T**, Nehlsen K & Wirth D (2016). Functional immortalized cell lines for development of bioassays (poster). 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology. Seville.

Danksagung

Hiermit möchte ich einigen Personen danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit für mich nicht möglich gewesen wäre. Als erstes geht mein Dank an InSCREENex als wirklich tollen Arbeitgeber und unser super Team. Damit möchte ich auch gleich meinem Betreuer Dr. Tobias May für die Bereitstellung des interessanten Themas danken, sodass überhaupt erst die Durchführung einer Promotion möglich wurde. Weiterhin danke ich Dr. Tobias May für die unglaublich gute Unterstützung während der gesamten Arbeit und ganz besonders für die letzte Phase des Schreibens. Weiterhin gilt mein Dank Dr. Roland Schucht für die unzähligen Gespräche und außerordentliche Unterstützung bei einfach Allem. Außerdem danke ich Jeannette Zauers dafür, dass nie etwas im Labor gefehlt hat und sie mir immer helfen konnte, sobald Fragen bei mir auftauchten. Weiterhin danke ich dem restlichen Inscreenex-Team Kristina Nehlsen, Aileen Bleisch, Martin Luckner und Caro. Auch Kathrin Lenfers möchte ich dankend erwähnen, da sie ihre Masterarbeit bei mir durchgeführt hat.

Außerdem danke ich meinem Mentor Prof. Dr. Michael Steinert, der besonders in der letzten Phase dazu beigetragen hat, dass der Verteidigung dieser Arbeit keine Steine in den Weg gelegt wurden. Zusätzlich danke ich meinem Thesis Committee (Dr. Robert Zweigerdt und Dr. Till Strowig) für die Einbringung interessanter Ideen und Vorschläge. Zudem möchte ich Prof. Dr. Theresia Stradal für die freundliche Übernahme des Korreferats und Begutachtung dieser Arbeit danken. Außerdem dafür, dass sie überzeugt von dem Zellsystem war und es in einem anschließenden Projekt gefördert hat. Auch bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dieter Jahn für die kurzfristige Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Darüber hinaus möchte ich unserem Projektpartner dem Fraunhofer-Institut für die Bereitstellung des Ausgangsmaterials und für die hilfreichen Telefonkonferenzen danken.

Der HZI-Gradschool danke ich für die Bereitstellung verschiedener Weiterbildungen und zugleich Dr. Sabine Kirchhoff für die Beantwortung vieler Fragen und Unterstützung besonders in der Zeit vor der Abgabe.

Bei Prof. Dr. Manfred Rohde und Dr. Sabrina Mühlen bedanke ich mich für die Entstehung nützlicher und zusätzlicher Ergebnisse. Auch Dr. Julia Horstmann danke ich für die zahlreichen Gespräche und Durchführung gemeinsamer Experimente bis zur ersten gemeinsamen Publikation. Außerdem danke ich ihr für das Gegenlesen meiner Arbeit. Sie ist mir eine sehr gute Freundin geworden.

Vielen Dank auch an meine Freundin Dr. Clarissa Müller für die nützlichen Tipps bei der Formatierung. Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, die mich unglaublich unterstützt haben und immer Verständnis für mich hatten. Mein größter Dank gilt meinem tollen Ehemann Felix, der immer für mich da war und in den wichtigen Phasen viele Sachen für mich übernommen hat. Vielen Dank dafür, dass du immer meine üblen Launen ertragen hast und auch in frustrierenden Momenten hinter mir standest.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungen	XIII
Zusammenfassung	XV
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Verdauungsorgan – Aufbau und Funktion	2
1.2 Zelltypen des Dünndarms und wichtige Signalwege	3
1.2.1 Enterozyten	5
1.2.2 Panethzellen.....	5
1.2.3 Gobletzellen.....	6
1.2.4 Enteroendokrine Zellen	7
1.2.5 Stammzellen.....	7
1.2.6 Wnt- und R-Spondin Signalweg.....	9
1.3 Primäre Zellen vs. immortalisierte Zellen	10
1.3.1 Primärzellen.....	10
1.3.2 Zelllinien	11
1.4 Immortalisierung.....	12
1.4.1 CI-SCREEN Immortalisierung	13
1.5 <i>In vitro</i> Modelle zur Medikamententestung im Dünndarm	14
1.5.1 Caco-2 Zelllinie	14
1.5.2. HT-29 Zelllinie	15
1.5.3 ModeK Zelllinie	15
1.6 <i>In vitro</i> Dünndarmzellsysteme – zweidimensionale (2D) vs. dreidimensionale (3D) Kultivierung	16
1.6.1 Organoide aus <i>in vitro</i> differenzierten Stammzellen	16
1.6.2 Enteroide aus Primärmaterial	17
1.7 Wirt-Pathogen Wechselwirkungen	18
1.8 Ziel der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	23
2.1.3 Zellkultur-Medien	24
2.1.4 Kits	25
2.1.5 Antikörper	25
2.1.6 Plastik und Beschichtungen	26

2.2 Methoden	26
2.2.1 Isolation genomischer DNA	26
2.2.2 Isolation eukaryotischer RNA	26
2.2.3 cDNA-Synthese	27
2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und qRT-PCR.....	28
2.3 Zellkultur	34
2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	34
2.3.2 3D-Kultivierung von primären Krypten in Matrigel	34
2.3.3 Produktion von Lentiviren	35
2.3.4 Aufkonzentrierung der Lentiviren mit dem LentiX-Konzentrator	36
2.3.5 Infektionsdurchführung	36
2.3.6 Gelelektrophorese	36
2.4 Charakterisierung der Darmepithelzellen	37
2.4.1 Kumulative Populationsverdopplung	37
2.4.2 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen.....	37
2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse zur phänotypischen Charakterisierung	38
2.4.4 Immunfärbung in 2D- und 3D-Kultivierung	38
2.4.5 Analyse des Transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)	39
2.4.6 Serotonin-ELISA.....	40
2.4.7 Elektronenmikroskopie	40
2.4.8 Alcianblau-Färbung	41
2.4.9 Infektion mit Enteropathogenen <i>E. coli</i> (EPEC).....	41
3. Ergebnisse.....	43
3.1 Kultivierung und Charakterisierung der murinen intestinalen Organoide	43
3.2 Optimierung der Transduktion und Immortalisierung in 2D und 3D.....	51
3.3 Transduktion von intestinalen Zellen in 2D-Kultivierung.....	54
3.4 Generierung funktionaler intestinaler Darmzellen aus der Maus.....	59
3.4.1 Enterozyten	69
3.4.2 Gobletzellen.....	80
3.4.3 Enteroendokrine Zellen	86
3.4.4 Panethzellen.....	89
3.5 3D-Entwicklung der Klone in Matrigel und Analyse Zelltyp-spezifischer Marker auf RNA-Ebene.....	92
3.6 Zelloberfläche	95
3.7 Optimierung der Kultivierungsbedingungen	97
3.8 Einfluss der Kultivierungsstrategie auf die Marker-Expression	107
3.9 Anwendungen der generierten Darmepithelzelllinien	109
3.9.1 EPEC-Infektion	109

4. Diskussion	112
4.1 2D- vs. 3D-Kultivierung zur Medikamentenentwicklung	112
4.2 Charakterisierung der Enterozyten (Mrp1, ZO-1, Ecadherin, TEER) im Vergleich zu Caco-2	114
4.3 Immortalisierungsstrategien und Genintegration.....	118
4.3.1 Funktion der Immortalisierungsgene und Beeinflussung der Immortalisierung der Darmzellen.....	123
4.3.2 Regulation der Immortalisierung.....	126
4.4 Einfluss der Beschichtung auf die Adhäsion der murinen intestinalen Kryptenkultur	128
4.4.1 Gelatine	130
4.4.2 Kollagen I	130
4.4.3 Fibronectin.....	130
4.5 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die physiologischen Eigenschaften der generierten murinen intestinalen Zelllinien.....	132
4.6 TA-Vorläuferzellen mit Darmepithel-Eigenschaften.....	135
4.7 Vergleich der generierten intestinalen Darmzellen mit ModeK, HT-29 und Caco-2	138
5. Ausblick	143
6. Literatur	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer intestinalen Krypte.	4
Abbildung 2: Differenzierung der Stammzellen in absorptive Enterozyten oder sekretorische Zelltypen.....	9
Abbildung 3: Entstehung der komplexen Krypten-Struktur.	44
Abbildung 4: Expression verschiedener Zelltyp-spezifischer Marker auf mRNA-Ebene zur Charakterisierung der murinen intestinalen Organoide.	46
Abbildung 5: Quantitative Analyse Zelltyp-spezifischer Marker der murinen intestinalen Organoidkulturen mittels qRT-PCR.	48
Abbildung 6: Charakterisierung der intestinalen Kryptenkulturen.	50
Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Immortalisierungsstrategien in 2D- und 3D-Kultivierung.	51
Abbildung 8: Optimierung der Beschichtung der Zellkulturgefäße.....	52
Abbildung 9: Optimierung der Zellkulturmedien.	53
Abbildung 10: Analyse der Transduktionseffizienz.	55
Abbildung 11: Analyse der Transduktionseffizienz der zweidimensional kultivierten Darmepithelzellen.....	56
Abbildung 12: Entstehung der Klone aus Infektion I9.	58
Abbildung 13: Morphologien der verschiedenen Klone.	60
Abbildung 14: Wachstumskurven exemplarisch ausgewählter Klone.	61
Abbildung 15: Analyse der integrierten Immortalisierungsgene.....	62
Abbildung 16: Einteilung der generierten Klone nach unterschiedlicher Epcam-Expression.....	65
Abbildung 17: Übersicht der analysierten Zelltyp-spezifischen Marker von generierten Klonen der Infektion I12.....	67
Abbildung 18: Analyse des Stammzellmarkers Lgr5.	68
Abbildung 19: Expressionsanalyse des Enterozytenmarkers Villin.....	70
Abbildung 20: Expression des Transporters Mrp1 einiger Klone	70
Abbildung 21: Expression des Chloridkanals CFTR	71
Abbildung 22: Immunzytochemie spezifischer Epithelzellmarker Ecadherin und ZO-1 in 2D-Kultivierung.	73
Abbildung 23: Immunzytochemie des spezifischen Epithelzellmarkers ZO-1 im Vergleich der 2D-Kultivierung mit dem Transwellsystem (TW).....	75
Abbildung 24: Immunfärbung auf TW exemplarischer Klone zum Nachweis der Barriere-funktion mittels ZO-1.	76
Abbildung 25: Aufbau des Transwellsystems zur Messung des TEERs.....	77
Abbildung 26: Verlauf der Widerstand-Ausbildung nach einer Woche Kultivierung..	77
Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Transwell des Klons I12K2 mit Schnitt durch die Zellebene	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 28: Analyse der Mucin2-Expression auf RNA-Ebene für ausgewählte Klone im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (NIH 3T3 und IECs) und des Primärmaterials.	81
Abbildung 29: Immunfärbung des Proteins Mucin2.	83
Abbildung 30: Vergleich verschiedener Fixierungsmethoden zur optimalen Anfärbung der Schleimschicht mittels Alcianblau-Färbelösung.	84
Abbildung 31: Alcianblaufärbung zur Bestimmung der Mucussekretion in Stammzell-Medium.....	85
Abbildung 32: Analyse der Serotonin-Sekretion im Transwellsystem für exemplarisch ausgewählte Klone.	87
Abbildung 33: Expression des enteroendokrinen Markers ChromograninA normalisiert zur murinen intestinalen Kryptenkultur.	89
Abbildung 34: Expression der Panethzellmarker Defensin5 und Lysozym1 normalisiert zu den IECs.	90
Abbildung 35: Expression des Panethzellmarkers CD24.....	91
Abbildung 36: Darstellung der 3D-Struktur nach 21 Tagen Kultivierung in Matrigel .	92
Abbildung 37: Entwicklung der 3D-Strukturen nach 3-4 Wochen Kultivierung in Stammzell-Medium.....	93
Abbildung 38: Oberflächenstrukturen von generierten Zelllinien und ModeK sowie NIH 3T3.....	96
Abbildung 39: Funktionale Analyse der Mucusproduktion in Medium mit abnehmender Konzentration des Stammzell-Mediums.	98
Abbildung 40: Morphologie von I9K6 der Passage 17 in verschiedenen Medien nach 14 Tagen bzw. 17 Tagen Kultivierung.	100
Abbildung 41: Medienvergleich bei der Ausbildung des epithelialen Widerstandes.	102
Abbildung 42: Mucussekretion bei der Kultivierung in Stammzell-Medium und H/Dadvanced.....	103
Abbildung 43: 3D-Strukturen in H/Dadvanced (untere Reihe) im Vergleich zum Stammzell-Medium (obere Reihe) für 3 Klone nach 7 Tagen Kultivierung in Matrigel.....	105
Abbildung 44: Vergleich der Markerexpression von dreidimensional kultivierten Klonen in H/Dadvanced-Medium.....	106
Abbildung 45: Vergleich der Markerexpression spezifisch für Panethzellen (Lysozym), Stammzellen (Lgr5) und Enterozyten (Villin1) bei verschiedenen Kultivierungsstrategien	108
Abbildung 46: Infektionsstudie mit EPEC zur Auflösung der Barriere mit zwei verschiedenen Klonen.....	111
Abbildung 47: Darstellung der EPEC-Infektion mit Auflösung der Barrierefunktion	117
Abbildung 48: Darstellung der Teilung von Stammzellen und Aufbau der Stammzellnische im Krypt	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	22
Tabelle 2: Chemikalien	23
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 4: Grundmedien	24
Tabelle 5: Medien-Zusätze	24
Tabelle 6: Medienzusammensetzung	24
Tabelle 7: Kits.....	25
Tabelle 8: Primärantikörper	25
Tabelle 9: Sekundärantikörper.....	25
Tabelle 10: Plastik	26
Tabelle 11: Beschichtungen für Zellkulturgefäße.....	26
Tabelle 12: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mix.....	28
Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zum Nachweis integrierter Immortalisierungsgene.....	29
Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente	29
Tabelle 15: Primerpaare zum Nachweis integrierter Immortalisierungsgene.....	29
Tabelle 16: Zusammensetzung des PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente	30
Tabelle 17: PCR-Programm zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente	30
Tabelle 18: Primerpaare für PCR zum Nachweis Zelltyp-spezifischer Gene auf mRNA-Ebene	31
Tabelle 19: Zusammensetzung des qRT-PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente	32
Tabelle 20: qRT-PCR-Programm zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente ...	33
Tabelle 21: Primerpaare für qRT-PCR zum Nachweis Zelltyp-spezifischer Gene auf mRNA-Ebene	33
Tabelle 22: Zusammensetzung der verschiedenen Fixierungslösungen	41
Tabelle 23: Einordnung der verschiedenen Marker zu den unterschiedlichen Zelltypen des Dünndarmepithels	45
Tabelle 24: Übersicht der erzeugten Zelllinien aus den zwei Immortalisierungsansätzen.....	59
Tabelle 25: Gene der CI-SCREEN-Genbank zur Immortalisierung der Zellen aus kombinierter 2D- und 3D- Immortalisierungsstrategie (I9).....	63
Tabelle 26: Gene der CI-SCREEN- Genbank zur Immortalisierung der 2D-Strategie (I12)	63
Tabelle 27: Zusammenfassung der prozentualen Genintegration beider Immortalisierungsansätze.....	64

Tabelle 28: Einteilung der Klone aus der Infektion I9 und I12 in niedrige (<1000 MFI) und hohe (>1000 MFI) Expression von Epcam sowie heterogene oder homogene Epcam-Expression	66
Tabelle 29: Übersicht der analysierten Zelllinien zur Ausbildung des TEERs über mehrere Wochen	78
Tabelle 30: Organoid-Bildung der generierten Zelllinien nach 1-2 Wochen Kultivierung in Stammzell-Medium. Grün bedeutet eine Organoid-Bildung, wobei die rot markierten Zelllinien keine Organoide in Matrigel-Kultivierung zeigten. .	94
Tabelle 31: Übersicht über die Populationsverdopplung pro Tag einiger Klone bei der Kultivierung nach 2-3 Wochen in verschiedenen Medien	101

Abkürzungen

A/E-Läsionen	<i>attaching and effacing</i> -Läsionen
BFP	<i>bundle-forming-pilus</i>
Bmi-1	Polycomb complex Protein
Cdk4	Cyclin-anhängige Kinase 4
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystische Fibrose conductance Regulator
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DII4	<i>delta-like</i> kanonischen Notch Liganden 4
DMT-1	zweiwertiger Metallionentransporter-1
DT	Diphtherietoxin
ECM	extrazelluläre Matrix
EBV	Epstein-Bar-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
FCS	fetales Kälberserum
FESEM	Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GIP	Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-1	Gucagon-like Peptide 1
HPV	humane Papillomviren
hTert	humane Telomerase
Id3	inhibitor of DNA-binding 3
IEC	murine intestinale Epithelzelle
Klf4	Kruppel-like Faktor 4
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
Lgr5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LPS	Lipopolysaccharid
Mgam	Maltase-Glucoamylase
MEF	murine embryonale Fibroblasten

MFI	Mittlere Fluoreszenzintensitäten
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRP1/ABCC1	Multidrug-Resistenz-Protein 1
NEEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NHE3	Natrium-Wasserstoff-Transporter
NOD2	Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-beinhaltende Domäne 2
N-WASP	neurales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Populationsverdopplung
P-gp	P-Glykoprotein
pRB	retinoblastoma susceptibility Protein
RT	Raumtemperatur
SGLT-1	Natrium/Glucose Cotransporter-1
Sis	Sucrase-Isomaltase
Tag	SV40 large T Antigen
TA-Zellen	Transit-amplifizierende Zellen
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
Tir	translocated intimin Rezeptor
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
tPA	gewebsspezifischer Plasminogenaktivator
TW	Transwells
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
VPA	Valproinsäure
WNT3	Wingless Int-3 Protein
ZO	Zonula Occludens

Zusammenfassung

Der Dünndarm ist an der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen beteiligt und liefert den ersten Kontakt zu Pathogenen. Er stellt den größten Teil des Immunsystems dar und aus diesem Grund ist es besonders wichtig, dass die unterschiedlichen Zelltypen ihren verschiedenen spezialisierten Aufgaben nachkommen. Der Darm besteht aus Krypten, wobei die intestinalen Stammzellen in der Nische sitzen und in der Lage sind in alle Zelltypen des Dünndarms - Panethzellen, enteroendokrine Zellen, Gobletzellen und Enterozyten - zu differenzieren.

In dieser Arbeit wurden ausgehend von murinen intestinalen Krypten, die *in vitro* als Organoidkulturen expandiert wurden, neuartige Zelllinien etabliert. Für diesen Prozess wurde zunächst eine Transduktionsstrategie für die Organoidkulturen optimiert und insgesamt 42 neue Zelllinien immortalisiert.

Nachfolgend wurden die immortalisierten Zellen auf die Expression von verschiedenen Zelltyp-spezifischen Eigenschaften untersucht, um die vielversprechendsten Zelllinien zu identifizieren. Aus den initialen Charakterisierungen wurden ca. 10 Linien ausgewählt, die eingehender charakterisiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinien enge Zell-Zell-Kontakte aufwiesen, die durch Zonula Occludens-1 (ZO-1) und Ecadherin Expression sowie mittels einer Barrieremessung nachgewiesen wurden. Weiterhin konnte mithilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass die Zellen teilweise Mikrovilli ausbildeten. Außerdem zeichneten sich die Zelllinien durch eine für Gobletzellen-charakteristische Schleimproduktion aus, die sowohl auf RNA und Proteinebene als auch funktional nachgewiesen wurde. Zudem zeigten die Zelllinien Markerexpression von enteroendokrinen Zellen (Serotonin-Sekretion) und von Panethzellen (Defensin, Lysozym, CD24-Expression). Abschließend wurden die Zellen erneut in komplexe 3D-Umgebung überführt und bildeten Organoid-Strukturen aus. Die Daten deuten darauf hin, dass die neuartigen Zelllinien nicht terminal differenziert sind, sondern Vorläuferzellen. Um die generelle Anwendbarkeit dieser Zellen zu verbessern, wurde ein Medium neu entwickelt, welches die zellulären Eigenschaften erhält. Darüber hinaus konnte in einer ersten Studie mit einem enteropathogenen *E. coli* (EPEC) gezeigt werden, dass durch das TypIII-Sekretionssystem die zelluläre Barriere aufgelöst wird und der Erreger den Wirt infizieren kann.

1. Einleitung

Der Darm stellte sich vor einigen Jahren als wichtiger Teil des Immunsystems heraus und ist somit essentiell für die Gesundheit des Menschen (Sompayrac 2016). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie z.B. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zählen zu den häufigsten Krankheiten in Deutschland (Stallmach et al 2012). Bisher haben die *in vitro* Darm-Modelle wie T84 oder Caco-2 zum besseren Verständnis der funktionalen Darmphysiologie und Krebsbiologie beigetragen (Artursson 1990). Da diese aber wesentliche Nachteile zeigen, die später genauer erläutert werden, ist die Entwicklung von guten Primär-ähnlichen Darmmodellen unabdingbar. Deshalb hat die Organoid-Technologie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Unter dieser Technologie versteht man die Möglichkeit Teile des Gewebes aus dem Organismus zu isolieren und über eine längere Zeit in Kultur zu halten. Diese längere Kultivierung kann erfolgen, da Stammzellen im isolierten Material enthalten sind, die in alle weiteren Zelltypen des Dünndarmepithels differenzieren können. Diese intestinalen Stammzellen werden für Transplantationsstudien, Medikamentenentwicklung und Transportstudien genutzt. Außerdem bilden sie die Grundlage zur Entstehung von Minidärmen (Organoide), die besonders für die Darmforschung und bei der Aufklärung von Darmerkrankungen wie CED von Vorteil sind (Sato et al. 2009, Review Holmberg et al. 2017). Mit diesen Darmsystemen können Transportphysiologie, Entwicklungsbiologie, Pharmakologie und Pathophysiologie bedeutend vorangebracht werden. Diese Organoid-Modelle ermöglichen die Durchführung von spezifischen Funktionsstudien zur Sekretion und Absorption in jedem bestimmten Abschnitt des Darms sowie die Untersuchung früher Reaktionen während einer Infektion. Beispielsweise können die Interaktionen von T-Zellen und Epithelzellen genauer analysiert werden (Rogoz et al. 2015) oder Infektionen exemplarisch in einer Studie mit Rotavirus gezeigt werden (Saxena et al. 2016). Diese Minidärme sind einerseits Organoide, die aus induzierbaren pluripotenten Stammzellen (McCracken et al. 2011) oder andererseits Enteroide, die aus Stammzellen direkt aus dem Dünndarm (Sato et al. 2011) entstehen. Die häufigste akute Darminfektion ist die Pathogen-induzierte Gastroenteritis. Dafür gibt es noch kein geeignetes Medikament, dass wirksam die Pathogene bekämpft (Casburn-Jones 2004, Thiagarajah et al. 2015). Diese Darm-assoziierten Infektionen werden häufig durch z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*), Salmonellen oder Shigellen hervorgerufen. Die

Behandlung einer solchen Infektion mit Antibiotika ist allerdings kontraproduktiv, da bakterielle Erreger Resistenzen durch Mutationen oder deren Übertragung erlangen können und außerdem für den Organismus nützliche Bakterien bekämpft werden. Somit richten Antibiotika mehr Schaden als Nutzen an, da die Virulenz verbessert wird und das Pathogen noch gefährlicher für den Wirt wird. Pathogen-assoziierte Gastroenteritis tritt aufgrund von Ungleichgewicht von Elektrolytaufnahme und Elektrolytabsonderung auf, sodass mehr Wasser abgegeben wird (Thiagarajah et al. 2015). Um Medikamente finden zu können, müssen die genauen Abläufe erkannt werden, wobei Organoide die Analyse von Transportmechanismen und Wirt-Pathogen Interaktionen ermöglichen.

1.1 Das Verdauungsorgan – Aufbau und Funktion

Der Darm stellt den größten Teil des Immunsystems dar, wobei er ständig Antigenen, verschiedensten Nahrungsbestandteilen und Bakterien ausgesetzt ist. Über die große Oberfläche des Darms können Pathogene eindringen, die eine schnelle Immunantwort erfordern. Der Dün- und der Dickdarm bilden einen Schlauch in dem sich das säulenartige Epithel befindet. Der Dünndarm geht in den Dickdarm über und kann in drei verschiedene Abschnitte eingeteilt werden. Dabei wird das Duodenum (Zwölffingerdarm) in der Nähe des Magens, das Jejunum (Leerdarm) und am Ende das Ileum (Krummdarm) unterschieden (Speckmann et al. 2006). Im Jejunum sind dünne und lange Villi zu finden, die den umfangreichen Bürstensaum bilden. Die Mikrovilli enthalten die benötigten Verdauungsenzyme und Nährstofftransporter. Der Dünndarm ist deutlich länger und schmaler im Durchmesser als der Dickdarm. Er wird durch Ausstülpungen charakterisiert, die als Villi bezeichnet werden. Diese vergrößern die Oberfläche, um eine möglichst effektive Verdauung der Nahrung und damit Aufnahme der Nahrungsbestandteile zu gewährleisten. Die Zellen an der Oberfläche des Epithels erneuern sich ständig über die Stammzellen der Lieberkühn-Krypten, wobei die Stammzellen in die verschiedenen Zelltypen des Dünndarms differenzieren können (Barker et al. 2007) und dabei zum Villus nach oben wandern. Die meisten Zellen sind absorptive Enterozyten neben den vorkommenden Panethzellen, Becherzellen und neuroendokrinen Zellen. Außer Panethzellen, die nach unten Richtung Stammzellen in den Krypten wandern, wandern die anderen Zelltypen bis zur vollständigen Differenzierung zur Spitze des Villus, wo sie dann nach 4-5 Tagen

absterben (Barker 2014). Durch die kontinuierliche Wanderung und Veränderung der Zellen muss sich das Immunsystem an die ständig neue Umgebung anpassen.

1.2 Zelltypen des Dünndarms und wichtige Signalwege

Einerseits kann durch die große Oberfläche des Dünndarms ein guter Nährstoffaustausch gewährleistet werden und andererseits wird somit eine große Kontaktfläche für Pathogene geliefert. Aus diesem Grund sind die verschiedenen Zelltypen des Dünndarms auf unterschiedliche Aufgaben spezialisiert. Zum einen sollen die Zellen Schutz vor pathogenen Erregern gewährleisten und zum anderen eine große Kontaktfläche für die Nahrungsaufnahme liefern. Da das Immunsystem nicht zwischen einer Symbiose der Darmbakterien und Pathogenen aus der Umwelt unterscheiden kann, müssen zunächst die Organismen vor dem Eindringen in das Epithel abgehalten werden, sodass eine besondere Barriere erzeugt und konstant gehalten werden muss. Die Zelltypen des Dünndarms können grob in zwei Klassen eingeteilt werden, die absorptiven Enterozyten und die sekretorischen Zellen wie Panethzellen, Gobletzellen und enteroendokrine Zellen (Review Hooper 2015). Allgemein sind sekretorische Zellen in der Lage Stoffe auszuschütten, die zum einen den Dünndarm schützen sollen und zum anderen die Verdauung anregen. Die Stammzellen sind in der Lage in alle anderen Zelltypen des Dünndarms zu differenzieren und bilden deshalb die Grundvoraussetzung für die Entstehung komplexer Krypten-Strukturen (Abbildung 1). In direkter Nähe der Stammzellen liegen die Panethzellen, die durch die Sekretion antimikrobieller Peptide eine schützende Funktion aufweisen (Ayabe et al. 2000) und außerdem wichtige Faktoren wie den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Wingless Int-3 Protein (WNT3) und den *delta-like* kanonischen Notch Liganden 4 (Dll4) für die Stammzellerhaltung abgeben (Clevers & Bevins 2013, Sato et al. 2011). Weiterhin zählen zu den sekretorischen Zellen die Becherzellen, die eine Mucus-Schleimschicht sekretieren, um das Darmepithel vor Pathogenen und anderen Darmerregern abzusichern (Johansson et al. 2008). Weiterhin können enteroendokrine Zellen Hormone wie z.B. Serotonin absondern, um die Darmperistaltik anzuregen (Hansen & Witte 2008). Den Hauptteil des Darmepithels machen die Enterozyten aus, die eine dichte Barriere bilden, um den Organismus vor eindringenden Pathogenen zu schützen. Außerdem sind sie für die Nährstoffaufnahme, durch ihre vergrößerte Oberfläche mit den Villin Strukturen,

verantwortlich und ermöglichen eine Aufnahme von Nahrungsbestandteilen wie z.B. Zuckern (Lu et al. 2013, Moran 1985).

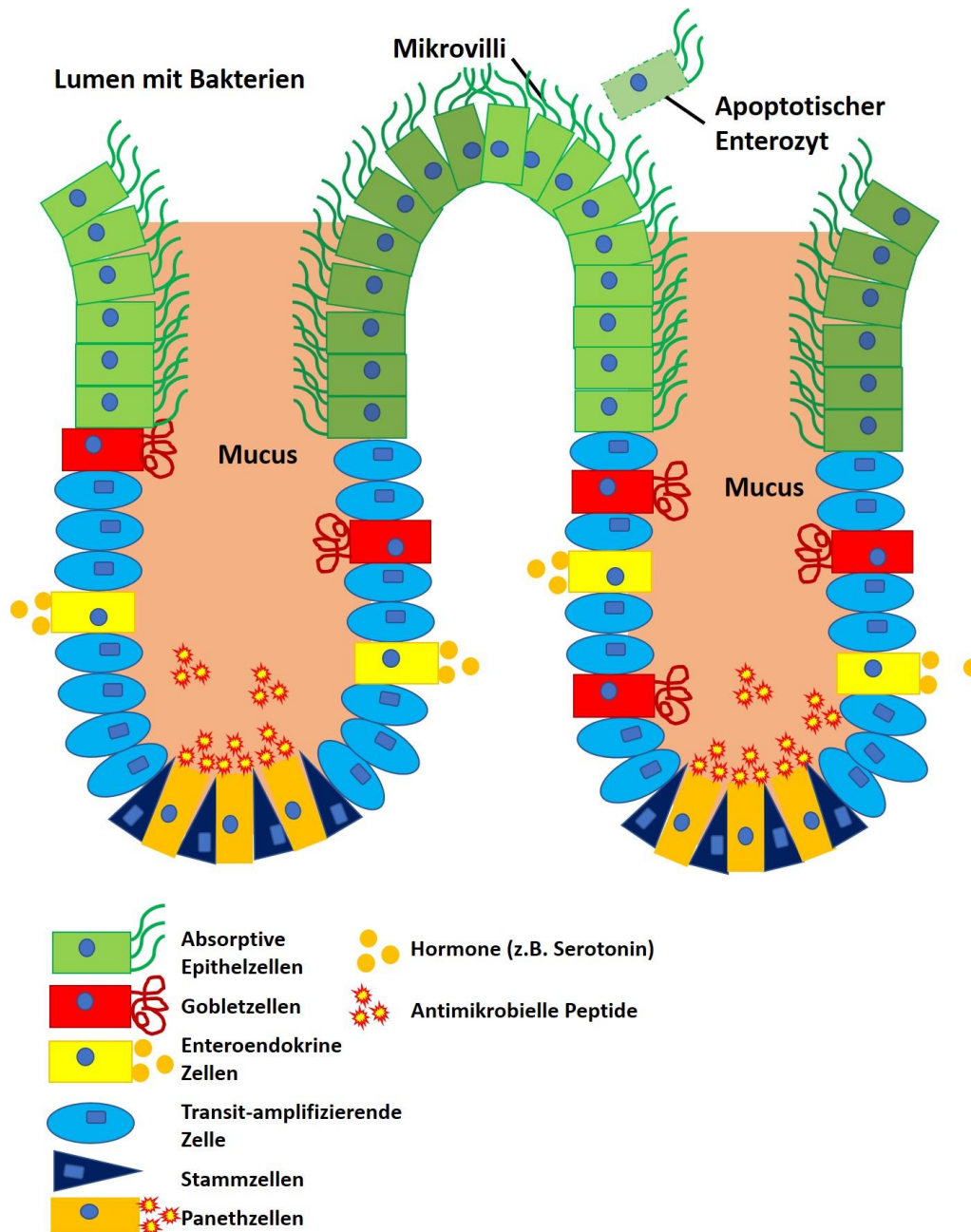


Abbildung 1: Aufbau einer intestinalen Krypte.

Die Oberfläche des Epithels wird von dünnen Mikro villi der Enterozyten bedeckt, die damit den Bürstensaum ausbilden. Das ermöglicht eine enorme Oberflächenvergrößerung zur Verdauung und Absorption von Nahrungsbestandteilen. Stammzellen (blau) sitzen in der Kryptennische und differenzieren in die unterschiedlichen Zelltypen des Dünndarms. Zum einen differenzieren die Stammzellen in die sekretorischen Zellen wie Panethzellen (orange), enteroendokrine Zellen (gelb), Gobletzellen (rot) und zum anderen in die absorptiven Enterozyten (grün). Nach einigen Tagen sterben die Enterozyten an der Spitze des Kryptvillus ab und werden durch neue Zellen, die aus der Stammzellnische nach oben wandern, ersetzt. Die Gobletzellen produzieren die schützende Schleimschicht und Panethzellen sekretieren antimikrobielle Peptide, wobei die Panethzellen ganz in der Nähe der Stammzellen verbleiben. (modifiziert nach Mowat & Agace 2014).

1.2.1 Enterozyten

Den Hauptteil des Darmepithels kleiden die Enterozyten aus. Sie dienen der Nährstoffaufnahme und als Barriere für die Mikrobiota. Auf der apikalen Seite sind Mikrovilli zu finden, die der Oberflächenvergrößerung dienen und den Bürstensaum bilden. Die Nährstoffe aus der Nahrung werden apikal aufgenommen und basolateral weiter exportiert. Die Enterozyten sind in der Lage dichte Zell-Zell-Kontakte auszubilden, indem die Zellen durch *tight junctions* oder auch Occludin-Proteine miteinander verbunden werden. Diese Kontakte werden über Proteine wie z.B. Ecadherin, Claudin oder ZO-1 geschaffen (Bondow et al. 2012, Holmes et al. 2006). Somit wird der parazelluläre Transport unterbunden und die Nährstoffe müssen durch die Zellen aufgenommen werden. Außerdem ist eine dichte Barriere zum Schutz wichtig, um Pathogene abwehren zu können. Enterozyten sind für die Aufnahme von Zucker, Aminosäuren, Fette und Vitamine verantwortlich. Weiterhin werden durch aktiven Transport Ionen wie z.B. Natrium, Calcium, Magnesium und Eisen resorbiert. Dafür werden ganz spezielle Membranproteine wie z.B. Hephästin und Ferroportin benötigt. Für die Verdauung von Zuckern ist der Natrium/Glucose-Cotransporter (SGLT-1) essentiell, da dieser Monosaccharide wie Glucose und Galaktose transportiert (Wright et al. 2003, Levin 1994). Auch die Resorption von Eisen in Form von zweiwertigen Ionen Fe^{2+} erfolgt über die apikale Seite der Enterozyten. Dafür müssen zunächst die dreiwertigen Eisenionen Fe^{3+} von einer Ferrireduktase reduziert werden. Danach erfolgt der aktive Transport in das Zellinnere über das Transportprotein namens zweiwertiger Metallionentransporter-1 (DMT1) (Morgan & Oates 2002). An der basolateralen Seite erfolgt der Weitertransport mittels Ferroportin in den extrazellulären Raum, wobei das Fe^{2+} wieder zu Fe^{3+} von beispielsweise Hephästin oxidiert wird. Zum Schluss erfolgt die Bindung des Eisens an Transferrin und der Abtransport über das Blut (Le & Richardson 2002, Anderson et al. 2002).

1.2.2 Panethzellen

Panethzellen sind größtenteils im Ileum aufzufinden und sehr langlebig. Sie wandern bei der Differenzierung aus den Stammzellen nach unten in die Nähe der Stammzellen, um diese mit antimikrobiellen Peptiden besonders zu beschützen. Die pyramidal geformten Zellen befinden sich in kleinen Zellclustern in den Krypten und enthalten dichte Granula, die die antimikrobiellen Peptide wie z.B. Lysozym und Defensin enthalten und REGIIIγ (regenerating islet-derived protein IIIγ) als Antwort auf IL-22. Diese Eigenschaft lässt auf eine sehr hohe sekretorische Aktivität schließen (Bevins &

1. Einleitung

Salzman 2011). Über die sekretierten Vesikel werden die antimikrobiellen Stoffe abgegeben und diese schützen den gesamten Dünndarmabschnitt vor dem Eindringen von Pathogenen (Furness et al. 2013). Die Zellen können über verschiedene Rezeptoren wie z.B. den Toll-ähnlichen Rezeptor (TLR) und Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-beinhaltende Domäne 2 (NOD2) stimuliert werden (Ouelette 2010, Clevers & Bevins 2013). Aus diesem Grund stellt NOD2 einen spezifischen Marker für Panethzellen dar, da Fremdstoffe über diesen Rezeptor erkannt werden (Lala et al. 2003). Ein weiterer Marker für Panethzellen ist das Oberflächenprotein CD24, welches von Sato et al. 2011 auf den EGF, transformierenden Wachstumsfaktor (TGF α), Wnt3 und Notch-Liganden Dll4 exprimierenden Panethzellen, in der Stammzellnische nachgewiesen wurde (Sato et al. 2011). Panethzellen produzieren pro-EGF, WNT3 und Notch-Liganden und spielen deshalb eine wichtige Rolle im Krypten-Aufbau (Sato et al. 2011).

1.2.3 Gobletzellen

Dieser Zelltyp des Dünndarms wird auch Becherzelle genannt und produziert Schleim, wobei dieser Zelltyp überall verteilt im Darmepithel vorkommt. Ungefähr 10-15 % des Dünndarms bestehen aus Becherzellen. Sie zeigen eine typische becherartige Form, die durch die sekretorischen Vesikel entsteht. Diese Vesikel bestehen aus dem Protein Mucin2 (Muc2), welches zu dichten Polymeren zusammengelagert ist (Birchenough et al. 2015). Die Zellen sekretieren eine Glycocalyx, die als lose Schicht auf den Zellen aufliegt (Hansson 2012). Als physiologische Barriere wirken diese Mucin-Glycoproteine toxisch auf einige Bakterien. Auch Antikörper und antimikrobielle Peptide, die von Paneth- und enteroendokrinen Zellen sekretiert werden, lagern sich in diese lose Schicht zum Schutz ein (Johansson et al. 2011). Die schleimartige Konsistenz des Mucus entsteht dadurch, dass bei einem niedrigen pH-Wert und hoher Calcium-Konzentration aneinanderhängende Ringstrukturen gebildet werden. Diese Ringstrukturen können sich bis auf ihr 1000-faches nach der Absonderung aus der Zelle entfalten, sobald die Calciumionen entfernt und der pH-Wert durch die Ausschüttung von Bicarbonationen erhöht wird (Ambort et al. 2012, Pelaseyed et al. 2014). Glycosaminglucane sind negativ geladen, sodass positiv geladene Natriumionen angezogen werden und ein Wassereinstrom in die Ringstrukturen eingeleitet wird. Diese entstandene Schicht ist beim Menschen ca. 50-200 μ m dick. Die Produktion von Mucus wird durch Leukotriene, Interferon γ , IL-9 und IL-13

kontrolliert (Bancroft et al. 1998, Steenwinckel et al. 2009). Die Schleimschicht dient neben der Ausbildung einer Barriere weiterhin dazu, die teilverdaute Nahrung besser voranzubringen und die Epithelschicht feucht zu halten (Moran et al. 2011). Bei den Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa werden die Aufgaben des Mucus nicht mehr exakt ausgeführt und es kommt zu Entzündungen im Darm. Aus diesem Grund ist eine Forschung in diesen Bereichen von hoher Bedeutung.

1.2.4 Enteroendokrine Zellen

Die enteroendokrinen Zellen machen nur 1 % des Dünndarmepithels aus und sind für die Freisetzung von Hormonen verantwortlich (Sternini et al. 2008). Im Darm der Maus wurden bisher 16 verschiedene Subtypen der enteroendokrinen Zellen identifiziert. Sie geben verschiedene regulatorische Faktoren ab wie das Glucoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP), das Peptidhormon Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und das Vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP). Diese dienen der Regulation von Verdauung, Darmbewegung und Nahrungsaufnahme (Moran et al. 2008). Weitere gastrointestinale Peptidhormone wie Serotonin beeinflussen beispielsweise Vorgänge in der Leber, in der Bauchspeicheldrüse und im Magen (Hansen & Witte 2008).

1.2.5 Stammzellen

Stammzellen dienen der Erhaltung verschiedener Funktionen des Darms. Das intestinale Epithel besteht aus Einstülpungen (Krypten), die stark proliferierende Zelltypen enthalten. Außerdem sind Villi-Strukturen als fingerähnliche Ausstülpungen vorhanden, die ins Lumen hereinragen und 3-10 Tage für ihre vollständige Erneuerung benötigen. Es können zwei verschiedene Stammzellarten unterschieden werden. Zum einen die aktiv proliferierenden Zellen (Transit-amplifizierende – TA-Zellen) und zum anderen die statischen Zellen zum Erhalt der intestinalen Homöostase. Beide Stammzellarten besitzen überlappende Marker und ähnliche Lokalisationen in den Krypten. Die aktiv proliferierenden Stammzellen, sitzen über den Panethzellen am oberen Ende der Einstülpungen. Die statischen Stammzellen sind direkt bei den Panethzellen zu finden (Potten et al. 1974). Charakteristisch für die proliferierenden Stammzellen ist der Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5), wobei an diesen Liganden R-Spondin binden kann. Diese Stammzellen sind für die Erneuerung des Darmepithels verantwortlich. Lgr5 geht als β -Catenin Zielgen aus dem Wnt-Signalweg hervor. 14-16 Lgr5-positive Stammzellen können pro Krypte

1. Einleitung

gefunden werden (Barker et al. 2007). Sie sind weniger empfindlich gegenüber radioaktiver Strahlung als ausdifferenzierte Epithelzellen (Hua et al. 2012). Die Dauer eines Zellzyklus beträgt 21,5 h und bei der Mitose teilen sich die Zellen symmetrisch. Außerdem wurden Marker wie Smoc2 als stammzelltypisch herausgestellt (Schepers et al. 2011). Die statischen Stammzellen sind als Reserve zu betrachten, die bei einer Verletzung induziert werden können. Sie können unter anderem über den Marker Hopx charakterisiert werden (Yan et al. 2012). Weiterhin wurde herausgefunden, dass diese Art von Stammzellen sensibler gegenüber fremden Einflüssen sind und schneller absterben als die Lgr5-positiven Stammzellen (Zhu et al. 2013).

Wie in Abbildung 2 dargestellt gibt es für die aus den Stammzellen hervorgehenden Zellen zwei charakteristische Gene zum einen für sekretorische Zellen (Panethzellen, Becherzellen und enteroendokrine Zellen) das Gen *Math1* (Yang et al. 2001) und für die absorptiven Zellen (Enterozyten) das Gen *Hes1* (Suzuki et al. 2005). Die TA-Vorläuferzellen stoppen und differenzieren in die funktionalen Epithelzellen. Bevor diese Zellen die terminale Differenzierung und Reifung erzielt haben, teilen sie sich ständig. Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von bestimmten Zelltypen des Darmepithels. Notch induziert die Stammzellen dazu *Hes-1* zu exprimieren, welches *Math-1/Atoh-1* hemmt und somit zu einer verringerten Zahl sekretorischer Zellen und eher zu absorptiven Enterozyten führt (Zecchini et al. 2005, Stanger et al. 2005, Fre et al. 2005). Die Hemmung des Notch-Signalweges führt hingegen zu einer erhöhten Anzahl von sekretorischen Zellen, wobei dabei die absorptiven Zellen weniger vorhanden sind (van Es 2005, 2010, Riccio 2008, Kazanjian 2010). Dies ist auf die stärkere Expression von Atoh-1 zurückzuführen, denn Atoh-1 wird negativ durch die Notch Aktivität reguliert (van Es et al. 2005).

Zum Wachstum von intestinalen Organoiden *in vitro* werden Wachstumsfaktoren benötigt. Diese bestehen aus EGF, Noggin und R-Spondin, die zur selbstständigen Erneuerung, Multipotenz und Organoid-Bildung beitragen (Sato et al. 2009). Noggin bindet an das BMP4-Protein, sodass es inaktiviert wird. Dadurch wird der BMP/Smad-Signalweg blockiert, der die Stammzellen proliferativ hält (He et al. 2004).

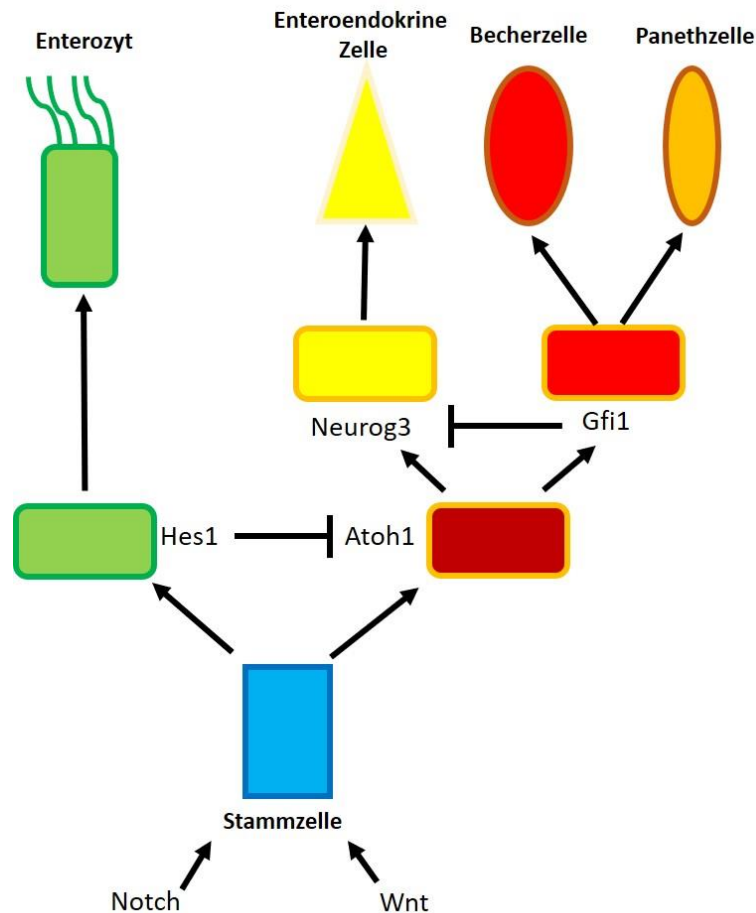


Abbildung 2: Differenzierung der Stammzellen in absorptive Enterozyten oder sekretorische Zelltypen.

Dargestellt sind Schlüsselereignisse für die intestinale Differenzierung von Epithelzellen. Die Stammzellen (blau) erhalten Signale, die zur Differenzierung in absorptive Enterozyten oder sekretorische Zelltypen (Panethzellen, Enteroendokrine Zellen und Gobletzellen) führen. Notch führt zur Expression von Hes1, welches Atoh1 hemmt, sodass Enterozyten entstehen (grün). Atoh1-exprimierende sekretorische Vorläuferzellen (dunkelrot) exprimieren einen Notchliganden, der über Neurog3 zur Differenzierung in Enteroendokrine Zellen führt. Gfi1 hingegen hemmt Neurog3, sodass Gobletzellen (rot) oder Panethzellen (orange) entstehen (angepasst und modifiziert nach Noah et al. 2011).

1.2.6 Wnt- und R-Spondin Signalweg

Stammzellen sind in der Lage sich selbst zu erneuern und differenzierende Tochterzellen zu bilden. Dieser Prozess wird streng reguliert über Signale aus der Stammzell-Nische oder durch intrazelluläre Signalkaskaden (Watt & Hogan, 2000). Neben dem Notch-Signalweg gibt es eine weitere wichtige intrazelluläre Kaskade, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und Homöostase verschiedener Organe spielt, indem er die Proliferation und Differenzierung von Zellen kontrolliert (Clevers 2006, Van Amerongen & Nusse 2009, Clevers & Nusse 2012). Im Magen-Darm-Trakt ist der Wnt-Signalweg entscheidend für die Entwicklung und Erneuerung des intestinalen Epithels. Wnt kann den

traditionellen und nicht-traditionellen Signalweg aktivieren. Der traditionelle Signalweg ist abhängig von β -Catenin, welches das hauptsächliche Effektorprotein darstellt. Sobald kein Wnt vorhanden ist, liegt β -Catenin gebunden vor und wird abgebaut, sodass der Wnt-Signalweg inaktiviert ist. Im Gegensatz dazu unterbindet die Bindung von Wnt an den Frizzled-Rezeptor den Abbau von β -Catenin, sodass es sich im Zellkern anreichert und an Transkriptionsfaktoren bindet, die zur Expression von bestimmten Genen führen. Bei den nicht-traditionellen Signalwegen werden die Ausrichtung der Zellen und der Calcium-Signalweg beeinflusst, wobei dies β -Catenin unabhängig erfolgt. Zielgene der Wnt-Signalwege sind beispielsweise Axin2, c-Myc und CD44. Myc ist für die postnatale intestinale Kryptenbildung verantwortlich (Bettess et al. 2005) und reguliert die Größe und Proliferation der Krypten (Muncan et al. 2006). R-Spondin wurde als Voraussetzung für die längere Stabilisierung von β -Catenin und die damit einhergehende Expression der Zielgene und Stammzellerneuerung entdeckt (Yan et al. 2017).

1.3 Primäre Zellen vs. immortalisierte Zellen

Die Kultivierung von Zellen außerhalb des Organismus ist in vielen Bereichen unabdingbar geworden (Carrell 1912). Gentechnisch veränderte Zellen werden für die Herstellung rekombinanter Proteine benötigt und weiterhin werden Zellen für die Medikamentenentwicklung (Goldbard 2006, Horrocks et al 2003, Eglen & Reisine 2011) und *in vitro* Toxizitätstests genutzt, um Tierversuche zu vermeiden. Auch in der Medizin werden für die Diagnostik und Entwicklung von Implantaten Zellkulturen verwendet (Freshney 2010, Nicholas & Kriegstein 2010). Sowohl Primärzellen als auch Zelllinien zeigen spezifische Vor- und Nachteile für bestimmte Anwendungen.

1.3.1 Primärzellen

Der Vorteil von Primärzellen liegt darin, dass sie direkt aus dem Organ oder Gewebe isoliert werden und somit besonders gut das *in vivo* Verhalten widerspiegeln können. Deshalb eignen sich primäre Zellen besonders für die Erforschung zellulärer Prozesse. Trotzdem beeinflusst der Isolierungsprozess die gewebsähnlichen Eigenschaften, sodass aufwendige Isolierungsprotokolle notwendig sind. Dabei entstehen hohe Kosten und ein großer Zeit- und Personalaufwand, sodass die Zellisolierung nur schwer standardisiert werden kann (Krukemeyer & Spiegel 2005). Primärzellen können nur begrenzt kultiviert werden (Levy et al. 1992, Pelengaris et al. 2002), da

nach einer bestimmten Zeit die Hayflick-Grenze erreicht wird (Hayflick & Moorhead 1961). Sie verlieren nach einer bestimmten Zeit charakteristische Eigenschaften, weil die Zellen auf künstlichen Oberflächen kultiviert werden und den Kontakt zu anderen spezifischen Zelltypen verlieren. Außerdem wird die Reproduzierbarkeit durch die Donorvariabilität wie z.B. genetische Heterogenität zwischen den Spendern, Umwelteinflüsse und den Isolationsprozess negativ beeinflusst. Ein weiterer Nachteil von Primärzellen sind die komplexeren Ansprüche an das Kultivierungsmedium als bei den etablierten Zelllinien.

1.3.2 Zelllinien

Zelllinien können unbegrenzt wachsen und stehen für die Anwendungen in ausreichender Menge zur Verfügung, sodass dadurch eine leichte technische Handhabung möglich ist. Sie können aus Gewebe oder Tumoren isoliert werden, indem eine spontane oder induzierte Immortalisierung primärer Zellen erfolgt. Dabei können jedoch spezifische Eigenschaften verändert werden, aber trotzdem verfügen Zelllinien über konstantere Eigenschaften, sodass die Reproduzierbarkeit zuverlässiger ist (Stacey & MacDonald 2001, Horrocks et al. 2003). Die Isolierung von Zellen aus Tumoren führte zu heute standardmäßig verwendeten Zelllinien wie z.B. HeLa-Zellen (Gey et al. 1952). Jedoch ähneln Tumorzellen den physiologisch normalen Zellen nur wenig und machen die gezielte Immortalisierung von Primärmaterial interessant. Zelllinien können für viele Anwendungen genutzt werden wie beispielsweise zur Analyse grundlegender Zellfunktionen, immunologischer, virologischer und toxikologischer Tests. Diese Tests reduzieren die Kosten zur Medikamentenentwicklung, da unter anderem auch auf Tierversuche verzichtet werden kann. Ein Nachteil von Zelllinien ist, dass sie die *in vivo* Situation nicht uneingeschränkt darstellen können, da sie durch die verwendeten Onkogene oder Tumorigenität verändert wurden (Vass-Marengo et al. 1986, Strauss & Griffin 1990, Horrocks et al. 2003). Es sollte also stets abhängig von der Anwendung entschieden werden, welches Zellsystem verwendet werden kann. Für die Proteinproduktion können Zelllinien durch ihre hohe Produktivität, Stabilität und Robustheit genutzt werden. Die Medikamentenentwicklung benötigt jedoch eher physiologisch relevante *in vitro* Testsysteme.

1.4 Immortalisierung

Es gibt zelluläre Prozesse, die die Proliferation beeinflussen, indem beispielsweise nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen das Hayflick-Limit erreicht wird, da die Telomere eine kritische Länge erlangen (Hayflick & Moorhead 1961). Weitere Faktoren wie die Tumorsuppressoren p53 und *retinoblastoma susceptibility* Protein (pRB) haben einen Einfluss auf die Proliferationsbegrenzung. Das p53-Protein reguliert als Transkriptionsfaktor die Zellzykluskontrolle, die Apoptose, die Differenzierung oder auch die Reparaturmechanismen von geschädigter DNA, indem es die Transkription bestimmter Gene aktiviert oder inaktiviert (Oren 1999, Ashcroft & Vousden 1999). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss auf den Zellzyklus nimmt das pRB-Protein, welches die Transkription positiv oder negativ reguliert und somit die Apoptose einleiten kann (Murphree & Benedict 1984, Kaelin 1999, Burkhardt & Sage 2008). Zur Immortalisierung bzw. Auslösen der Unsterblichkeit müssen diese Replikationsbegrenzungen beseitigt bzw. in diese Kontrollen eingegriffen werden. Dies kann über karzinogene bzw. ionisierende Strahlung oder Transduktion von immortalisierenden Genen erfolgen. Somit wird den Zellen durch verschiedene Onkogene ein unbegrenztes Wachstum ermöglicht. Die ersten Ansätze zur Immortalisierung wurden durch die Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) geliefert (Todaro & Green 1963). Bei der Kultivierung erreichten die Zellen ihr Replikationslimit, wobei einige Zellen durch spontane Mutationen weiterwuchsen. Für andere Zelltypen mussten jedoch andere Immortalisierungsstrategien gefunden werden. Für eine effiziente Immortalisierung werden virale Onkogene genutzt, die über virale Vektoren in die Primärzellen transduziert werden (Linder & Marshall 1990). Beispiele für virale Immortalisierungsgene sind SV40 large T Antigen (Tag), E6, E7 aus dem humanen Papillomavirus oder E1A und E1B aus dem Adenovirus. Sie können die Tumorsuppressorproteine p53 und pRB hemmen. E6 und E7 wurden beispielsweise für die Immortalisierung von Epithelzellen verwendet (Zhou et al. 2013). Dabei inhibiert E7 das Protein pRB und aktiviert p53, wohingegen E6 den Abbau von p53 fördert und die Zellzykluskontrolle unterbricht. Außerdem wurde auch die Aktivierung von der Telomerase durch E6 beobachtet (Munger et al. 2004). Als weiteres Beispiel dient die humane Telomerase (hTert), die die verkürzten Telomere aus der Replikation wieder verlängert (Blasco et al. 1997). Dadurch können die Zellen dauerhaft kultiviert werden, weil sie die Hayflick-Grenze überschreiten können. Dennoch führt die Verwendung dieser Onkogene zu drastischen Veränderungen des Phänotyps, sodass keine

physiologisch relevanten Zelllinien hervorgehen (Stacey & MacDonald 2001). Es sollte weiterhin zwischen immortalisierten und transformierten Zelllinien unterschieden werden (Strauss & Griffin 1990). Immortalisierte Zellen zeigen ein unbegrenztes Wachstum und transformierte Zellen können zusätzlich noch Tumore ausbilden (Drayton & Peters 2002). Da es kein generell gültiges Immortalisierungsprotokoll für jeden Zelltyp aus jeder Spezies gibt, müssen die unterschiedlichen Gene, die zur Immortalisierung führen immer neu herausgefunden und festgelegt werden (Rangarajan et al. 2004). Die klassischen Immortalisierungsmethoden führen also eher zu einem stark veränderten Phänotyp und sind nicht für alle Zelltypen anwendbar.

1.4.1 CI-SCREEN Immortalisierung

Bei der CI-SCREEN-Immortalisierung handelt es sich um eine Immortalisierungstechnologie, die Zellen mit möglichst Primär-ähnlichen Eigenschaften hervorbringen soll (Klein 2012). Dafür wurden 33 Gene ermittelt, die den Zellzyklus regulieren. In dieser Genbank befinden sich beispielsweise Onkogene (Yap1, Bmi1), Transkriptionsfaktoren (Sox2) und weitere Faktoren, die die Proliferation der Zellen (E2F1), Differenzierung (Nanog, Id2) oder Apoptose (Bcl2) beeinflussen (Klein 2012). Durch die spezifischere Wirkungsweise können diese Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle gezielt in die Regulationsprozesse des Zellzyklus eingreifen. Die Genintegration erfolgt mithilfe von Lentiviren, da sie primäre Zellen erfolgreich und effizient transduzieren können, indem die Fremd-DNA stabil ins Genom integriert wird. Lentiviren besitzen Einzelstrang-RNA und sind Retroviren, die in nicht replizierende Zellen integrieren können (Federico 2003). Für die Immortalisierung von Primärzellen kann die ganze Genbank oder ausgewählte Gene genutzt werden. Für die Selektion immortalisierter Zellen werden Antibiotika eingesetzt oder die Langzeitkultivierung durchgeführt, wobei die nicht-immortalisierten Zellen nach einer bestimmten Kultivierungszeit aufgrund des Replikationslimits absterben. Mit dieser Technologie können innerhalb von 3 Monaten Zelllinien generiert werden, die nach der Expansion auf Zelltyp-spezifische Eigenschaften analysiert werden. Diese Technologie konnte bereits Zelllinien hervorbringen wie beispielsweise humane Endothelzellen (Heiss et al. 2015), murine embryonale intestinale Epithelzellen (Schwerk et al. 2013) und alveolare Lungenzellen (Kuehn et al. 2016). Diese etablierten Zelllinien zeigen ähnliche Eigenschaften zum Primärmaterial.

1.5 *In vitro* Modelle zur Medikamententestung im Dünndarm

Bisher wurden Zelllinien wie Caco-2, HT-29 und ModeK zur Untersuchung des Darms verwendet. Obwohl sie einige Nachteile zeigen, stellten sie viele Jahre die gängigen Darm-Modelle dar. Diese Modelle werden *in vitro* genutzt, um die Absorption, Regulation des intestinalen Transports bei Gesundheit und Krankheit sowie die Wirkung von Darmpathogenen zu analysieren (Hilgers et al. 1990, Huet et al. 1987, Crockett et al. 2017). Bei diesen Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Krebszellen, die nicht den normalen, gesunden Darm widerspiegeln können. Diese Zelllinien wurden dennoch genutzt, um die intestinale Permeabilität und den Membrantransport darzustellen.

1.5.1 Caco-2 Zelllinie

Um die Krebsforschung voranzutreiben, wurden in den 1970er Jahren Zelllinien aus Tumoren isoliert. Für die Nutzung dieser Zelllinien musste diese jedoch zunächst differenziert werden. Caco-2 Zellen wurden aus dem humanen colorektalen Adenokarzinom generiert und differenziert, sobald die Zellen konfluent gewachsen sind (Hilgers et al. 1990, Artursson 1990). Außerdem zeigt diese Zelllinie viele Charakteristika von intestinalen Epithelzellen (Verhoeckx & Cotter 2015). Eine Polarität der Zellen konnte durch den Nachweis eines Bürstensaums mit Mikrovilli auf der apikalen Seite mittels Elektronenmikroskopie festgestellt werden. Auch wurden die typischen Verdauungsenzyme wie Lactase oder Aminopeptidase nachgewiesen. Durch die Kultivierung im Transwellsystem wurde bereits gezeigt, dass *in vivo* ähnliche Absorptionsbedingungen herrschen (Artursson & Karlsson 1991, Cheng et al. 2008). Caco-2 zeigt jedoch Unterschiede in der Protein- und Transporter-Expression und auch von Labor zu Labor verhalten sich die Zellen divers zum humanen Darm (Larregieu & Benet 2013, Sun et al. 2002). Außerdem spiegeln die Caco-2 Zellen nur Eigenschaften der intestinalen Enterozyten wider, wobei das humane intestinale Epithel auch noch aus anderen Zelltypen wie Gobletzellen, Panethzellen und enteroendokrinen Zellen besteht. Aus diesem Grund kann Caco-2 kein ausreichend geeignetes *in vivo* Modell darstellen. Die fehlende Schleimschicht auf den Zellen lässt Studien über Nahrungs- oder Medikamentenresorption nicht zu. Deshalb werden neue Darmmodelle benötigt, um die Wirt-Pathogen-Interaktionen während einer Infektion zu verfolgen.

1.5.2. HT-29 Zelllinie

Eine weitere humane intestinale Zelllinie ist die HT-29 Zelllinie, die sich von Caco-2 abgrenzt, indem sie Mucus produzieren kann. Sie wurde ebenso wie Caco-2 zunächst für die Krebsforschung genutzt (Fogh & Trempe 1975). Bei der Kultivierung verbraucht diese Zelllinie viel Glucose und wächst unpolarisiert, undifferenziert sowie mehrschichtig. Sie zeigt auch keine typischen Marker für Epithelzellen. Sobald Glucose durch Galactose ersetzt wird, differenzieren die Zellen 15 Tage nach Erreichen der Konfluenz in Enterozyten (Zweibaum et al. 1985). Aus diesem Grund wurden die HT-29 verwendet, um den genauen Differenzierungsprozess von Epithelzellen nachzuvollziehen. Sobald die Zellen differenziert sind, formen sie einen Monolayer mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten (*tight junctions*) und Mikrovilli auf einem Bürstensaum. HT-29 Zellen sind zwar ähnlich zu den Caco-2 Zellen, aber benötigen eine längere Zeit zur vollständigen Differenzierung (ca. 30 Tage) und zeigen niedrigere Enzymaktivität wie z.B. von Lactase (Zweibaum et al. 1985). Der Vergleich von Expressionsstärken von 377 Genen der Zelllinie mit anderen intestinalen Zelllinien sowie humanem Dickdarmgewebe, ergab keine signifikanten Unterschiede zu den Primärzellen (Bourguine et al. 2012). Der entscheidende Vorteil gegenüber Caco-2 Zellen ist die Fähigkeit Schleim zu produzieren. Die Zugabe von Methotrexat (MTX) ermöglicht die Transformation der HT-29 Zellen in Mucus-produzierende Epithelzellen (Huet et al. 1987, Lesuffleur et al. 1990). Zelllinien aus Tumorgewebe zeigen dennoch eine geringere Stabilität in der Kultivierung und besitzen nur eine begrenzte Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation (Damia & D'Incalci 2010, Lipps et al. 2013).

1.5.3 ModeK Zelllinie

Die ModeK Zellen wurden 1993 als murine Epithelzellen mit dem SV40 T-Antigen immortalisiert (Vidal et al. 1993). Im Unterschied zu Caco-2 und HT-29 handelt es sich nicht um Tumorzellen, sodass sie einen ähnlichen Phänotyp zu Primärzellen zeigen. ModeK Zellen sind außerdem in der Lage auf Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien sowie Cytokine zu reagieren (Crockett et al. 2017). Die Mucin2-Expression konnte bisher intrazellulär gezeigt werden (Horstmann et al. 2017), sodass die Sekretion nicht eindeutig sichergestellt ist. Absorption- bzw. Resorptionsstudien können nur bedingt auf die *in vivo* Situation übertragen werden.

1.6 *In vitro* Dünndarmzellsysteme – zweidimensionale (2D) vs. dreidimensionale (3D) Kultivierung

Um die wesentlichen Nachteile der *in vitro* Zelllinien zu umgehen, wurden neue Organoid-basierte Darm-Modelle entwickelt. Diese zeigen Primär-ähnlichere Eigenschaften und enthalten alle Zelltypen des Dünndarms. In der 3D-Organoid-Technologie werden zwei verschiedene Systeme unterschieden. Zum einen die Organoide, die aus pluripotenten Stammzellen oder embryonalen Stammzellen (ES) entstehen und zum anderen die Enteroide, wobei es sich um ex vivo kultivierbare primäre Organoide aus Patientenproben handelt.

Entscheidend für ein *in vivo* ähnliches System ist nicht nur die Zelllinie, sondern auch die Kultivierungsart. Bei der 2D-Kultivierung haften die Zellen an künstlichen Oberflächen des Kulturgefäßes und können nur eingeschränkt komplexe Zell-Zell-Wechselwirkungen und keine 3D-Strukturen ausbilden. Außerdem fehlt den Zellen der metabolische und proliferative Gradient während der 2D-Kultivierung. Die Zellen im Körper sind hingegen in einem komplexen Zellverband integriert, wodurch die 3D-Kultivierung mehr und mehr an Bedeutung gewinnen muss. Nur so können sich die heterologischen Zelltypen zusammenlagern, um die Aussendung von Zytokinen, Hormonen und die Bildung von kleinen Organen zu gewährleisten. Die Organoid-Technologie stellt ein gutes Beispiel für die 3D-Kultivierung dar. Hans Clevers erforschte die intestinalen Stammzellen der Krypten aus dem Dünndarm und Dickdarm (Barker et al. 2007). Die Stammzellen exprimieren Lgr5 und sind in der Lage in alle intestinalen Epithelzellen zu differenzieren, indem sie die Organoide formen (Sato et al. 2009). In den Organoiden wurde die Sekretion von Mucinen durch Becherzellen sowie die Lysozym-Produktion durch Panethzellen gezeigt (McCracken et al. 2011). Organoide eignen sich somit gut als *in vivo* ähnliches *in vitro* Modell.

1.6.1 Organoide aus *in vitro* differenzierten Stammzellen

Organoide entstehen aus *in vitro* induzierbaren pluripotenten Stammzellen oder embryonalen Stammzellen. Die Stammzellen können in 3D-Umgebung in humane intestinale Organoide differenzieren (McCracken et al. 2011, Spence et al. 2011). Organoide können große Teile des Darms mit Villi-ähnlichen Strukturen bilden, sobald sie unter die Nierenkapsel der Maus transplantiert wurden (Watson et al. 2014). Diese Organoide können wieder aus der Maus isoliert werden. Die Entstehung von Organoiden aus *in vitro* induzierbaren pluripotenten Stammzellen benötigt Activin A,

um Endoderm zu bilden. Die Expression von WNT3A und des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4 (FGF-4) führt zur Differenzierung des Endoderms in CDX-2 exprimierenden Darm, der 3D-Sphäroide ausbilden kann. Wachstumsfaktoren wie EGF, Noggin und R-Spondin-1 vergrößern die Sphäroide und verbessern die Differenzierung in humane intestinale Organoide (McCracken et al. 2011). Diese Organoide setzen sich dann aus den Stammzellen, Panethzellen, epithelialen Transportzellen, Becherzellen, enteroendokrinen Zellen und das Mesenchym zusammen, welches das Epithel umgibt. Das Mesenchym besteht aus Myofibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Ein Nachteil der aus Stammzellen differenzierten Organoide ist die nicht ausgeprägte Segmentspezifität, indem keine bestimmte Proteinexpression im Duodenum, Jejunum und Ileum oder Dickdarm erfolgt (Spence et al. 2011). Dennoch zeigen die Zellen Polarisation und manche Transportereigenschaften wie die Dipeptid-Absorption. Erst nachdem die *in vitro* differenzierten Organoide aus der Maus isoliert werden, können die intestinalen Zelltypen beobachtet werden, wobei die Enterozyten einen Bürstensaum und enge Zell-Zell-Kontakte zeigen. Außerdem können Bürstensaum-Proteine wie die Sucraseisomaltase (Sis) nachgewiesen werden (Watson et al. 2014). Der Vorteil von humanen intestinalen Organoiden aus Stammzellen gegenüber Enteroiden ist die Möglichkeit der genauen Nachverfolgung bestimmter Entwicklungsstadien und die Lumen-Bildung (Wells & Spence 2014, Sinagoga & Wells 2015). Myofibroblasten ermöglichen die Ausbildung einer komplexeren Stammzellnische verglichen mit Enteroiden. Die *in vivo* Transplantation führt erst zur Entstehung von ausdifferenzierten Zellen. Wobei als Nachteil die lange *in vitro* Differenzierungsdauer vor der eigentlichen *in vivo* Transplantation entscheidend ist (Watson et al. 2014).

1.6.2 Enteroide aus Primärmaterial

Bei Enteroiden handelt es sich um *ex vivo* kultivierte primäre Organoide aus dem Dünndarm isoliert von Kindern oder erwachsenen Patienten (Sato et al. 2011). Dabei werden die Biopsieproben endoskopisch oder bei operativen Eingriffen gewonnen. Besonders wichtig für die Kultivierung von humanen Krypten ist WNT3A, welches unter anderem von Panethzellen produziert wird. Trotzdem muss dieser Wachstumsfaktor zusätzlich dem Medium hinzugefügt werden, um die Stammzellnische zum kontinuierlichen Wachstum anzuregen (Sato et al. 2011). Diese Enteroide können aus jedem der drei Abschnitte des Dünndarms isoliert und über 2 Jahre in Kultur gehalten

werden (Sato et al. 2011). Es erfolgt ein gerichtetes Wachstum der Zellen, wobei sich Sphäroide formen, die apikal Mikrovilli aufweisen und basolateral bestimmte Proteine wie beispielsweise Ecadherin exprimieren (Foulke-Abel et al. 2015). Die Vorteile der Verwendung von Enteroiden ist die Spezifität zum bestimmten Abschnitt des Darms, die Möglichkeit genetische Krankheiten zu untersuchen, da die isolierten Stammzellen Spender-spezifisch sind. Außerdem können Gene mittels CRISPR/Cas9 verändert werden (Drost et al. 2015, Schwank et al. 2013, Matano et al. 2015). Weiterhin können diese Enteroide genutzt werden, um zerstörtes intestinales Gewebe zu regenerieren (Yui et al. 2012) oder für individualisierte Medikamentensuche oder -therapie verwendet werden (Dekkers et al. 2013). Nachteilig ist, dass die intestinale Entwicklung aus dem embryonalen Stadium nicht nachverfolgt werden kann und das Mesenchym sowie Immunzellen und Nervenbahnen fehlen (Sato et al. 2010). Zusammenfassend stellen sich als Vorteile für die Verwendung von Enteroiden zum einen der Erhalt des spezifischen Dünndarmabschnitts, die stabile Proteinexpression und zum anderen die Anwendung in Hochdurchsatz-Studien und physiologischen Studien sowie der personalisierten Medizin heraus. Nachteile sind die fehlende Ausbildung von Villi, keine Peristaltik und kein Blutfluss.

1.7 Wirt-Pathogen Wechselwirkungen

Einige Krankheiten wie beispielsweise Pathogen-assoziierte Gastroenteritis bringen heutzutage noch tausende Tote mit sich, wobei viele Darm-Pathogene noch nicht durch den Einsatz von wirksamen Medikamenten eingedämmt werden konnten. Das Pathogen *Vibrio cholerae* forderte in Haiti 10.000 Tote (Page et al. 2015). Auch Shiga-Toxin-produzierende *E. coli* in Europa und den USA (Jenkins et al. 2015, Luna-Gierke et al. 2014, Navarro-Garcia 2014) oder die zunehmenden Infektionen mit dem Erreger *Clostridium difficile* in Krankenhäusern (Warny et al. 2005, Martinez 2012, Brown et al. 2015) sind eine Bedrohung für die Menschen. Der Einsatz von Antibiotika schadet eher als das er nutzt, da Stämme entstehen, die resistent gegenüber Antibiotika sind oder die Bakterien angeregt werden noch mehr Virulenzfaktoren auszuschütten (Davies & Davies 2010, Garner et al. 2009, Hodges & Gill 2010, Willing et al. 2011). Es wurden mehr als 20.000 Resistenzgene mit 400 verschiedenen Untertypen durch bakterielle Genomsequenzierung vorhergesagt (Liu & Pop 2009). Die falsche, unermüdliche Anwendung von Antibiotika führt zu antibiotikaresistenten Bakterien. Ein Grund dafür sind die vielen existierenden Antibiotikaresistenzgene, die schon in den natürlichen

1. Einleitung

Bakterienpopulationen vorkommen (D'Costa et al. 2006). Bakterien sind in der Lage Gene miteinander auszutauschen, wobei dies über horizontalen Gentransfer erfolgt. Es wurden genomische Inseln mit Pathogenitätsinseln identifiziert (Hacker & Kaper 2000). In weiteren Studien wird die Analyse der Plasmid-vermittelten Übertragung von Antibiotikaresistenzen an Bedeutung gewinnen (Norman et al. 2009). Fehlende Behandlungsmöglichkeiten sind dadurch geschuldet, dass kein passendes bzw. ausreichendes Modell für Pathogen-induzierte Krankheiten vorhanden ist. Die neuen Modelle mittels Organoidtechnologie ermöglichen nun die Rollenaufklärung der verschiedenen Epithelzellen bei Pathogenbesiedlung, Vermehrung, Wirtschädigung und Bekämpfung der Infektion. Beispielsweise konnte die Bedeutung von Mucus bei der Infektion mit *Clostridium difficile* untersucht werden. *Clostridium difficile* reduziert zwar die Schleimproduktion, aber verändert die Oligosaccharid-Zusammensetzung des Mucus nicht (Engevik et al. 2014). Außerdem reguliert dieses Pathogen den Natrium-Wasserstoff-Transporter (NHE3) zur Natriumaufnahme herunter, sodass die hohen Natriumkonzentrationen im Stuhl der Patienten erklärt werden können (Engevik et al. 2014, Hayashi et al. 2004). Ein weiteres Beispiel ist die Analyse der *Salmonella*-Infektion, wobei *Salmonella enterica* in die epitheliale Barriere eindringt und in *Salmonella*-beinhaltenden Vakuolen verbleibt. Dabei verändert dieses Pathogen das transkriptionale Wirtprofil sowie die Zytokinexpression (Forbester et al. 2015). Weiterhin konnte die Wechselwirkung von Shiga-Toxin-produzierenden EHEC und dem humanen Dickdarm aufgeklärt werden (In et al. 2016). EHEC zerstört die innere Mucusschicht, indem die *E. coli* diese als Energiequelle zur Besiedlung nutzen (In et al. 2016, Erdem et al. 2007). Weiterhin können die Auflösung von Occludin und der Abbau des Bürstensaums genauer untersucht werden. Die 2D-Kultivierung stellt sich als vorteilhaft für die Identifizierung einzelner genetischer Unterschiede bei der Wirt-Pathogen-Wechselwirkung heraus und kann die Veränderungen der epithelialen Durchlässigkeit und Wirkstoff-Aufnahme bei normaler Physiologie im Vergleich zu Darminfektionen ermöglichen.

Weiterhin wurde die humane Rotavirus-Infektion mittels humaner intestinaler Organoide untersucht (Foulke-Abel et al. 2014, Saxena et al. 2016, Finkbeiner et al. 2012, Yin et al. 2015). Rotaviren replizieren und produzieren infektiöse Virionen in den Enteroiden (Saxena et al. 2016, Yin et al. 2015). Die Infektion findet am oberen Teil der Villi des Dünndarms statt (Foulke-Abel et al. 2015). Außerdem wurde das Rotavirus Antigen in den enteroendokrinen Zellen gefunden, die Serotonin produzieren während

der Gastroenteritis (Saxena et al. 2016). Diese Enteroide können auch in 2D-Umgebung kultiviert werden, um Ionen- und Wassertransporter zu identifizieren, die für die Rotavirus-induzierte Gastroenteritis verantwortlich sind. Die 3D-Kultivierung in Matrigel erschwert die Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen, da die Bakterien direkt ins Lumen der Organoide injiziert werden müssen. Durch die Kultivierung auf semipermeablen Wells können Pathogene direkt apikal auf die Zellen gebracht werden (VanDussen et al. 2015).

1.8 Ziel der Arbeit

Die Entwicklung neuer Medikamente aber auch die medizinische und biologische Grundlagenforschung benötigen möglichst primär-ähnliche Testsysteme. In der vorliegenden Arbeit wird die Generierung eines neuen *in vitro* Darmmodells beschrieben, mit dem Ziel, die *in vivo* Situation nachzubilden. Der Fokus lag dabei auf dem Dünndarm und seinen spezifischen Zelltypen. Dieser ist neben seinen Funktionen in der Nährstoffaufnahme sehr wichtig für die Immunabwehr. Das macht ein intestinales Modellsystem besonders interessant für die Infektionsforschung und das Verständnis über die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Auf der Basis einer funktionalen Immortalisierung sollten alle spezifischen Zelltypen des Dünndarms, möglichst schonend, unbegrenzt verfügbar gemacht werden. Dies erfolgte über die Inscreenex CI-SCREEN Technologie zur Immortalisierung primärer Zellen. Anschließend wurden die immortalen Zellen auf ihre Zelltyp-spezifischen Eigenschaften untersucht. Als Ausgangsmaterial für den Immortalisierungsansatz mittels CI-SCREEN Genbank dienten murine intestinale Darmorganoide, die aus den fünf verschiedenen Darmzelltypen bestanden: intestinale Stammzellen, Panethzellen, Gobletzellen, enteroendokrine Zellen und Enterozyten (Sato et al. 2009). Zunächst sollten in den neu generierten Zelllinien aus den murinen intestinalen Organoiden bestimmte Gene nachgewiesen werden, die zur funktionalen Immortalisierung geführt haben. Jede der Zelltypen hat eine bestimmte Aufgabe, die für die Funktion des Dünndarms wichtig ist. Daher wurden die neu generierten Zelllinien auch in funktionellen Studien charakterisiert. Ein wesentliches Ziel der Arbeit war die konkrete Anwendung der neuen intestinalen Zelltypen für die Forschung, sowie der Vergleich mit existierenden Darmzelllinien. Um die Zellen auch optimal anwenden zu können und leicht handhabbar zu machen, sollten die Kultivierungsbedingungen optimiert werden. Dafür wird möglichst kostengünstiges Medium benötigt, wobei trotzdem die

1. Einleitung

zelltypischen Eigenschaften erhalten bleiben sollten. Außerdem ist eine umfassende Charakterisierung auf die Zelltyp-spezifischen Eigenschaften essentiell. Dafür wurde die RNA auf Zelltyp-spezifische Marker untersucht, spezifische Marker mittels Immunfärbung betrachtet sowie Barrieremessungen, Mucusanfärbungen und ELISA-Analyse auf Hormonsekretion durchgeführt. Beispiele für spätere Anwendungen zur Analyse der Infizierbarkeit von Darmepithelzellen, sollten durch die Infektion mit EPEC gezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson
Einfrierbehälter	Mr Frosty	Thermo Fisher Scientific
Eismaschine	ZBE 150-100	Ziegra Eismaschinen GmbH
EVMOX Voltohmmeter	98965 A103	WPI
FACS	FACS Calibur	Becton Dickinson
Gefrierschrank (-20°C)	superöko energie	Privileg
	Premium NoFrost	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	-80 8860 V60/ 8800 Series	Thermo Fisher Scientific
Gelelektrophorese-System	Horizon 58	Whatman
	Horizon 58	Life Technologies
Inkubator	C200	Labotect
Kühlschrank (4°C)	Profi Line	Liebherr
Mikroskop	DMIL	Leica
	Axio Observer A1	Zeiss
	Axiovert 135 TV	Zeiss
Pipetten	Pipetman	Gilson
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand
	Easypet	Eppendorf
Platereader	Varioskan Flash	Thermo Scientific
	Multimode Reader LB 942	Berthold Technologies
	Sunrise	TECAN
Spannungsgeber	EV222	Peqlab Biotechnologies
Spektrophotometer Nanodrop	ND-100	Peqlab Biotechnologies
Sterilwerkbank	BDK-SK 1500	Luft- und Reinraumtechnik
Thermocycler	T3	Biometra
Thermomixer	Compact	Eppendorf
	5436	Eppendorf
Vakuumpumpe	N035 AN.18	KNF
Vortexer	Vortex Genie2 TM	Bender&Hobein AG, Zürich
	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	GFL	Omnilab
Wasserdeionisationsanlage	MilliQ	Merck Millipore
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Brand GmbH

2. Material und Methoden

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifuge	GS-15	Beckman
	Fresco Biofuge	Heraeus
	Multifuge X3FR	Heraeus

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Chemikalien

Lösung	Kat.-Nr	Hersteller
Aceton	67-64-1	J.T. Baker
Agarose	840004	Biozym
Alcianblau 8GX	278-333-8	Sigma-Aldrich
Cell Recovery Solution	354253	Corning
Chloroform	67-66-3	J.T. Baker
Cytofix/Cytoperm	554714	BD
Dimethylsulfoxid	D2650	Sigma-Aldrich
Essigsäure	3738.5	Roth
Ethanol	64-17-5	J.T. Baker
Fluoroshield with DAPI	F6057-20ML	Sigma-Aldrich
Isopropanol	67-63-0	J.T. Baker
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung 0,1 %	1001210500	Merck
Lenti-X Concentrator	631231	Takara Clonotech
Matrigel	354230	Corning
Methanol	67-56-1	J.T. Baker
Midori Green	MG04	Nippon Genetics European GmbH
Oligo(dT) Primer	10753741	Fisher Scientific
PCR-Marker	BIO-33053	Bioline
peqGOLD TriFast	300-023	Peqlab Biotechnologies
ProteinaseK	1019499	Qiagen
Roti Histofix (4 % PFA)	P087.3	Roth
2x Red PCR Master Mix	302004	Pjk GmbH
Saponin von Quillaja Bark	S4521	Sigma
SsoFast Eva Green SMX	1725204	Biorad
Triton X-100	39795.02	Serva

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Reagenzien	Zusammensetzung
PBS (pH 7,2-7,4)	27 mM KCl,
	140 mM NaCl,
	7,2 mM Na ₂ HPO ₄
	in MilliQ-H ₂ O
PBS*	PBS mit 2 % FCS
Trypsin	6 mM EDTA

2. Material und Methoden

Reagenzien	Zusammensetzung
HEBS	0,1 % Trypsin
	in PBS
	280 mM NaCl
	50 mM HEPES
1 x TAE-Puffer	1,5 mM NaHPO
	pH 7,1 in MilliQ
	40 mM Tris/Acetat (pH 7.5)
	20 mM NaOAc
Modified Bradley's Lösung	1 mM EDTA
	10 mM Tris/HCl (pH 7.5)
	2 mM EDTA
	10 mM NaCl
	0,5 % SDS
NaAc/Ethanol	1 mg/ml Proteinase K
	75 mM Natriumacetat in Ethanol

2.1.3 Zellkultur-Medien

Tabelle 4: Grundmedien

Grundmedium	Kat.-Nr.	Hersteller
Advanced DMEM/F12, 10 x 500 ml	11550446	Fisher Scientific
Dulbecco's Modifies Eagle Medium (DMEM)	41965-039	Gibco
F-12 Nut Mix (Ham)	21765-029	Gibco
IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)	06005	Stemcell Technologies

Tabelle 5: Medien-Zusätze

Medien-Zusätze	Kat.-Nr.	Hersteller
B27 Supplement ohne Vitamin A	11500446	Fisher Scientific
Fetales Kälberserum (FCS)	F7524	Sigma-Aldrich
Glutamax	35050038	Life Technologies
N-Acetyl-L-Cystein	A9165-5G	Sigma-Aldrich
N2-Supplement (100X)	11520536	Fisher Scientific
Rekombinantes murines EGF	315-09	Peprtech
Y-27632 (Rock Inhibitor)	1254	Tocris (Biotechne)

Tabelle 6: Medienzusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
DMEM3+	10 %FCS
	1 % Natriumpyruvat
	1 % HEPES (1M)
H/D	2 % FCS
	1 % Glutamin (200mM)
	1 % NEAA (100x)

2. Material und Methoden

Medium	Zusammensetzung
	0,1 % beta-Mercaptoethanol (50mM)
	0,5 % HEPES (1M)
H/Dadvanced	10 % FCS
	1:100 N2
	1:50 B27
	1 % HEPES (1M)
	1 % Glutamin (200mM)
	0,1 % N-Acetylcystein (1M)
	EGF (50 ng/ml)
	Rock (10µM)
	5 % FCS
Stammzell-Medium (Intesticult)	1:1000 Y-27632 (Rock)
	Nach Herstellerangaben
HuAEC (Airway-Medium)	Nach Herstellerangaben
mulNTEPI (IEC-Medium)	Nach Herstellerangaben
Endothelzell-Medium	Nach Herstellerangaben
Epilife-Medium	Nach Herstellerangaben

2.1.4 Kits

Tabelle 7: Kits

Kit	Kat.-Nr.	Hersteller
Revertaid cDNA synt Kit	K1622I	Life Technologies
Serotonin ELISA	KA1894	ABNOVA

2.1.5 Antikörper

Tabelle 8: Primärantikörper

Primärantikörper	Kat.-Nr.	Hersteller	Verdünnung
CD 24	12-0242-81	Thermo Fisher	1:100
Ecadherin (24E10)	3195S	Cell Signalling Technology	1:100
Epcam	12-5791	eBioscience	1:200
Mucin2	MA5-12345	Thermo Fisher	1:100
ZO-1	40-2200	Invitrogen	1:100

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Kat.-Nr.
Goat anti mouse Cy3	Dianova	115-165-068
Goat anti rabbit IgG Cy3	Dianova	111-166-045
Anti rabbit FITC	Dianova	111-095-045

2. Material und Methoden

2.1.6 Plastik und Beschichtungen

Tabelle 10: Plastik

Plastik	Bestellnummer	Hersteller
„Cell Saver“ Spitzen	729058	Biozym Scientific
Mikrotiterplatte Nunc MicroWell 96-Well	249570	Thermo Scientific
Transwell	10482181	Corning
24-well	10377841	Corning

Tabelle 11: Beschichtungen für Zellkulturgefäße

Coating	Zusammensetzung
KollagenG	Kollagen-Lösung Inscreenex
KollagenR	Kollagen-Lösung Inscreenex
Fibronectin/KollagenR	huAEC Beschichtungslösung Inscreenex
0,5 % Gelatine	Gelatine-Lösung Inscreenex

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation genomischer DNA

Für die Isolation von genomischer DNA wurden pro konfluentem 6-Well 500 µl Modified Bradleys-Reagenz und 1/20-verdünnte ProteinaseK (Qiagen, 1019499) benötigt. Die Suspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die geerntete hochmolekulare Lösung auf Raumtemperatur (RT) gebracht und anschließend mit 1 ml 100 % Ethanol mit 75 mM Natriumacetat langsam vermischt. Danach wurde das Gemisch 1 h stehen gelassen und durch Schwenken des Reaktionsgefäßes die chromosomale DNA ausgefällt. Zum Pelletieren der DNA wurde bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, indem die Ethanol-Lösung zum Pellet gegeben und es für 30 min stehen gelassen wurde. Danach folgte die anschließende Zentrifugation. Nach dem 2. Waschschrift musste das Pellet für ca. 20 min trocknen und wurde dann in 50 µl Elutionspuffer bei 37 °C für 10 min gelöst. Anschließend erfolgte die Analyse der integrierten Immortalisierungsgene mittels PCR.

2.2.2 Isolation eukaryotischer RNA

Zur Extraktion von RNA wurde peqGOLD TriFast verwendet, wobei nicht-degradierte RNA ohne DNA- und Protein-Verunreinigungen erhalten wurde. Diese RNA konnte zur Analyse Zelltyp-spezifischer Marker mittels PCR genutzt werden.

2. Material und Methoden

Die Zellen wurden entweder direkt aus der 2D-Kultur mit 1 ml TriFast abgelöst, wobei zuvor nur das Medium entfernt wurde. Bei der 3D-Kultivierung wurden die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen mittels Cell Recovery Lösung aus dem Matrigel geholt und das Zellpellet nach erfolgter Zentrifugation in 1 ml TriFast aufgenommen. Nach mehrmaligem Resuspendieren der Zellen wurden die Proben für 5 min bei RT stehen gelassen, um eine Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu ermöglichen.

Um eine Phasentrennung zu erhalten, wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben für 15 s kräftig geschüttelt. Danach wurden die Proben ca. 5-10 min stehen gelassen. Nach erfolgter Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g, wurde die Auftrennung der Phasen sichtbar. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA der Zellen, die dann in ein neues Reaktionsgefäß zusammen mit 500 µl Isopropanol präzipitiert wurde. In der Interphase und unteren roten Phenolphase befanden sich die DNA und Proteine der Zellen.

Die Fällung der RNA erfolgte durch Vermischen von 500 µl Isopropanol mit der RNA-Phase. Die Proben wurden für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Es sollte ein gelartiges Pellet am unteren Ende des Eppendorfgefäßes zu erkennen sein.

Zum Waschen und Lösen der RNA wurde der Isopropanol-haltige Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet zweimalig mit 75 % Ethanol gewaschen, wobei nach dem Vortexen für 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert wurde. Danach wurde das Pellet 1-2 h über Kopf unter dem Abzug getrocknet und anschließend in 25 µl RNase-freiem Wasser bei 58 °C auf dem Schüttler gelöst.

Mithilfe des Nanodrops wurde die Reinheit und Menge der isolierten RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Aussage über die Reinheit wurde über die Quotienten 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm getroffen, wobei der erste Quotient möglichst 2,0 und der zweite Quotient zwischen 2,0 und 2,2 liegen sollte. Danach konnte eine längere Aufbewahrung bei -70°C erfolgen oder die erhaltene RNA in cDNA zur weiteren Analyse umgeschrieben werden.

2.2.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA oder 5 µg RNA eingesetzt. Die isolierte RNA wurde über eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, um eine Analyse auf Zelltyp-spezifische Marker mittels Polymerasekettenreaktion durchzuführen. Die Template-RNA wurde mit 1 µl OligodT Primer und RNase-freiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 12 µl auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Dieses

2. Material und Methoden

Gemisch wurde für 5 min bei 65 °C erhitzt und danach kurz auf Eis gestellt. Nach anschließender Zentrifugation, um die gesamte Lösung im unteren Bereich des Reaktionsgefäßes zu sammeln, wurde 8 µl des cDNA-Synthese Mixes hinzu pipettiert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mix

Menge	Bestandteil
4 µl	Reaktionspuffer
1 µl	RicoLockRNase Inhibitor
2 µl	10mM dNTP Mix
1 µl	RevertAid M-MuLV RT
Σ 8µl	pro Ansatz

Nach kurzem Mischen und Anzentrifugieren erfolgte die cDNA-Synthese für 60 min bei 45 °C. Am Ende musste die Reaktion bei 70 °C für 5 min abgestoppt werden. Die erhaltene cDNA konnte nun für die weitere Analyse mittels PCR oder qPCR verwendet werden oder für längere Zeit bei -70 °C gelagert werden.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und qRT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion diente der Amplifikation von DNA- und RNA-Fragmenten, wobei die hitzebeständige Taq-Polymerase im dreischrittigen Prozess ein Template vervielfältigte. Zur Analyse Zelltyp-spezifischer Marker wurde zum einen die normale Polymerasekettenreaktion angewendet, die nur Aussagen darüber gab, ob das untersuchte Gen wirklich nachzuweisen war, indem eine Bande auf dem Gel sichtbar wurde. Zum anderen wurde auch die qRT-PCR verwendet, um eine quantitative Einschätzung der Genexpression im Vergleich zum Referenzgen oder der Referenzzelllinie zu erhalten.

Die Taq-Polymerase benötigte einen geeigneten Puffer, RNA oder DNA, spezifische Primerpaare und Desoxinukleosidtriphosphate um ein Genprodukt amplifizieren zu können (Tabelle 1). Die eingesetzten Primerpaare bestandenn aus dem forward Primer, der an den codierenden Strang bindet und dem reversen Primer, der sich an den dazu komplementären Strang anlagern kann.

2. Material und Methoden

Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zum Nachweis integrierter Immortalisierungsgene

Substanz	Volumen [μ l]
Revers Primer	25 μ l
forward Primer	25 μ l
DMSO	10 μ l
ddH ₂ O	90 μ l
Template	0,5 μ l
	Σ 7 μ l Biomix+7 μ l Mastermix

Für die Analyse der integrierten Immortalisierungsgene wurde das in Tabelle 14 aufgelistete PCR-Programm verwendet. Zuerst erfolgte die Denaturierung bzw. Aufspaltung des Template bei 94°C. Dann lagerte sich das Primerpaar bei einer Annealing-Temperatur von 58°C an. Bei 72°C hatte die Polymerase ihre optimale Aktivität, sodass die Primer in 5'-3'-Richtung verlängert wurden. Die Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 25mal bzw. 35mal wiederholt, sodass es zur exponentiellen Vermehrung der spezifischen DNA-Abschnitte kam.

Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

	Temperatur	benötigte Zeit	Zyklen
Initiale Inkubation	94°C	5min	1
Denaturierung	72°C	7min	
zyklische Denaturierung	94°C	30s	25 Wiederholungen
zyklisches Annealing	58°C	45s	
zyklische Elongation	72°C	240s	
finale Elongation	72°C	7min	1
Pause	16°C		

Primer und deren Sequenzen, die zur Analyse der integrierten Immortalisierungsgene genutzt wurden, sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Primerpaare zum Nachweis integrierter Immortalisierungsgene

	Name	Sequenz	Produktgröße
forward	SV40for1	GGAGGCCTAGGCTTTTGCAA	
revers	Id1	AGAAGCACCAAACGTGACCA	980 bp
	Id2	GCAGGCTGACAATAGTGGA	462 bp
	Id3	ATGACAAGTTCCGGAGCGAG	453 bp
	Myc	AGTGGGCTGTGAGGAGGTTT	1001 bp
	Fos	GGATGATGCTGGGAACAGGA	1054 bp
	E7	GCCCATTAACAGGTCTTCCA	404 bp
	Rex	GCGAGCTCATTACTTGCAGG	920 bp

2. Material und Methoden

	Name	Sequenz	Produktgröße
	Nanog	TATGGAGCGGAGCAGCATTC	935 bp
	Core	ACTTTACCCACGTTGCGCGA	487 bp
	Tag	CACCTGGCAAACCTTTCCTCA	1214 bp

Für die Amplifikation der spezifischen RNA-Fragmente wurden die in Tabelle 16 aufgelisteten Bestandteile benötigt.

Tabelle 16: Zusammensetzung des PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente

Substanz	Volumen [µl]
2x Red PCR MasterMix	7,5
Forward Primer	1,25
Revers Primer	1,25
DMSO	0,5
ddH ₂ O	4,5
Template	0,5

Zur Analyse Zelltyp-spezifischer Marker wurde das PCR-Programm in Tabelle 17 verwendet, wobei die Zyklen 35mal wiederholt wurden.

Tabelle 17: PCR-Programm zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente

	Temperatur	benötigte Zeit	Zyklen
Initiale Inkubation	94°C	5min	1
Denaturierung	72°C	7min	
zyklische Denaturierung	94°C	60s	35 Wiederholungen
zyklisches Annealing	58°C	45s	
zyklische Elongation	72°C	60s	
finale Elongation	72°C	7min	1
Pause	16°C		

Es wurden die in Tabelle 18 aufgelisteten Zelltyp-spezifischen Marker analysiert. Die Primer wurden generiert, indem die Gene für die Spezies Maus bei Pubmed gesucht wurden. Mithilfe der mRNA, die über die NCBI Referenz-Sequenz NM_ xy gefunden wurde, wurde mittels Primer3 das Primerpaar generiert. Dafür wurde die Nukleotid-Sequenz kopiert und in die Primer3-Datenbank zur Synthese eingefügt. Für die PCR-Analyse wurden Produktgrößen zwischen 500-1000 bp gewählt und für die Synthese der qRT-PCR Primer Produktgrößen zwischen 100-200 bp. Die dabei erhaltenen Sequenzen wurden über den UCSC Genombrowser kontrolliert, ob sie spezifisch die Produkte auf mRNA-Ebene darstellen oder auch noch im Genom binden können.

2. Material und Methoden

Sobald ein passendes Primerpaar gefunden wurde, wurden die spezifischen Produkte mittels PCR und Gelelektrophorese bzw. qRT-PCR-Analyse ermittelt.

Tabelle 18: Primerpaare für PCR zum Nachweis Zelltyp-spezifischer Gene auf mRNA-Ebene

Genname			Sequenz	Produktgröße
bActin	Act	forward	tggaatcctgtggcatccatgaaac	349 bp
		revers	taaaacgcagctcagtaacagtccg	
Caudal type homeobox 2	Cdx2	forward	tatcagcctcttttgcccca	512 bp
		revers	ggcttggttggtcgttaca	
Cystische Fibrose conductance Regulator	CFTR-1	forward	attacgtgggagtggctga	470 bp
		revers	aagtaagtctggcgctcgga	
	CFTR-2	forward	ctttgcagtgggctgtgaac	715 bp
		revers	atgggtctagatgggcact	
Claudin1	Cldn1	forward	ctttctgcatctgccactga	409 bp
		revers	caatgacagccatccacatc	
Claudin4	Cldn4	forward	ccgtcaaggccaagatcatg	55b bp
		revers	ttcagccccatattccaccag	
Claudin5	Cldn5	forward	ttaaggcacgggtagcactc	480 bp
		revers	tgatggtcaacggactctga	
Chromogranin	Chga	forward	cagactacagaccactccc	587 bp
		revers	cctaggtccctctgtggttg	
Ecadherin	Cdh1	forward	caaagtgcgctgaagtcca	466 bp
		revers	aaagaccggctgggtaaact	
Epcam	Epcam	forward	gagtcggaagaaccgacaag	463 bp
		revers	gacaccaccacaatgacagc	
Ferroportin	Slc40a1	forward	ccctgctctggctgtaaaag	561 bp
		revers	ggctccacattcacaaacct	
Hephästin-1	Heph-1	forward	gagggaccctggatggtaat	520 bp
		revers	tgacgaacttgccagtga	
Hephästin-2	Heph-2	forward	agtactgtgggcatgaagg	683 bp
		revers	ggccacatccttctctga	
Hephästin-3	Heph-3	forward	agtactgtgggcatgaagg	772 bp
		revers	ggcagggtctgagcagtaag	
Hephästin-4	Heph-4	forward	agtactgtgggcatgaagg	818 bp
		revers	gcatcctgtgtgtcttga	
Lgr5	Lgr5	forward	ttggagaaaggagagctgga	429 bp
		revers	agtcatgggtaagctggtg	
Lysozym1	Lyz1	forward	caggatgacatcactgcagc	521 bp
		revers	ctcacagactgctgtttcc	
Lysozym2	Lyz2	forward	caatcgttgtagttggcca	574 bp
		revers	gctgactgacaaggagact	
Mouse Atonal homolog 1	Math-1 (Atoh1)	forward	caacgacaagaagctgtcca	537 bp
		revers	gggcatttggtgtctcagt	
Multidrug resistance- associated protein 1	Mrp1	forward	gagcggaggctgatcaagag	858 bp
		revers	gtgggaagacgagttgctga	
Mucin2	Muc2	forward	gatggcacctacctcgttgt	465 bp
		revers	cttgtgctggggttttgt	

2. Material und Methoden

Genname			Sequenz	Produktgröße
Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2	Nod2	forward	gagttccaggcacagaggag	546 bp
		revers	gtaaggcagaggcagtggag	
Occludin	Ocln	forward	ctgcacgatgtctctgcaat	412 bp
		revers	ccctgtctggaaaacccaaaa	
Serotonintransporter	Slc6a4	forward	ggctgagatgaggaacgaag	546 bp
		revers	tattggaaaagccggagttg	
Synaptophysin	Syp	forward	tagttagctcatccgcctgg	563 bp
		revers	gatatggggatgggaagggg	
tight junction protein	Tjp1-1	forward	gatgaggttgtgtccggagt	413 bp
		revers	aggaccgtgtaatggcagac	
Trefoil Factor 3	Tff3	forward	gtggctcctaagcttgct	423 bp
		revers	cttggttggtgtgaggtc	
Villin1	Vil1	forward	gaggttcaaggcaacgagag	473 bp
		revers	agcttgagtgcagccttagc	

Für die qRT-PCR Analyse wurden ca. 500 ng cDNA eingesetzt. Dafür wurde die zuvor umgeschriebene RNA in cDNA vor der Verwendung 1:5 verdünnt. Außerdem wurde SybrGreen verwendet, welches an doppelsträngige und auch einzelsträngige DNA bindet und somit als DNA-Fluoreszenzfarbstoff dient (Tabelle 19). Es erfolgten somit quantitative Einschätzungen im Vergleich zum Referenzgen (*housekeeping* Gen) oder zur Referenzzelllinie wie z.B. NIH 3T3 oder murinen IECs. Die Proben wurden in 2-3 Replikaten auf eine 96-Wellplatte aufgetragen.

Tabelle 19: Zusammensetzung des qRT-PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente

Substanz	Volumen [µl]
Sybr Green	10
Forward Primer	1
Revers Primer	1
RNase freies Wasser	3
	Σ 15 µl + 5µl cDNA

Nachdem die 20 µl in jedes Well pipettiert wurden, erfolgt die Analyse mittels der Light Cycler 480 Maschine. Beim PCR-Programm wurden 45 Zyklen zur Vervielfältigung des Genproduktes verwendet (Tabelle 20). Die relativen Veränderungen der mRNA Level wurden mithilfe der Methode nach Pfaffl (Pfaffl 2001) analysiert. Es wurde nach den Transkriptionsleveln der verwendeten Referenzgene normalisiert und nach der Methode beschrieben von (Vandesompele et al. 2002) ausgewertet.

2. Material und Methoden

Tabelle 20: qRT-PCR-Programm zur Amplifikation spezifischer RNA-Fragmente

Schritt	Temperatur	benötigte Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Inkubation	95°C	15min	1
Amplifikation	95°C	15s	45
	58°C	20s	
	72°C	30s	
Schmelzkurve	95°C	5s	1
	70°C	1min	
	95°C	andauernd	
Kühlung	40°C	30s	1

In Tabelle 21 sind alle für die qPCR verwendeten Primerpaare alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 21: Primerpaare für qRT-PCR zum Nachweis Zelltyp-spezifischer Gene auf mRNA-Ebene

Genname			Sequenz	Produktgröße
Atonal homolog 1	Atoh-1	forward	GAGTGGGCTGAGGTAAAAGAGT	151 bp
		revers	GGTCGGTGCTATCCAGGAG	
bActin	bAct	forward	CTTTGCAGCTCCTTCGTTGC	197 bp
		revers	CCTTCTGACCCATTCCCACC	
Chromogranin A	Chga	forward	CAGCTCGTCCACTCTTTCCG	156 bp
		revers	GATGACTTCCAGGACGCACT	
Defensin5	Defa5	forward	TTGGGCTCCTGCTCAACAAT	168 bp
		revers	GACACAGCCTGGTCCTCTTC	
Epitheliales Zelladhäsionsmolekül	Epcam	forward	TCATTAGCAGTCATCGCGGG	130 bp
		revers	CTCAGCACGGCTAGGCATTA	
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Gapdh	forward	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	130 bp
		revers	TGAAGGGGTCGTTGATGGC	
hairy and enhancer of split-1	Hes-1	forward	CTGGTGCTGATAACAGCGGA	112 bp
		revers	ACTACTGAGCAGTTGAAGGTTT	
Homeodomain-only protein	Hopx2	forward	TCCTTAGTCAGACGCGCAC	189 bp
		revers	CAGGCGTGCTTAAACCATT	
Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5	Lgr5	forward	TACCCAGTTTGTGAGGCTGC	167 bp
		revers	CGGCAACGTAGAAAACGCAT	
Lysozym1	Lyz1	forward	TCTACAATCGTTGTGAGTTGGC	158 bp
		revers	ATAGTCGGTGCTTCGGTCTC	
Maltas-Glucoamylase	Mgam	forward	TGAGTTTGTGTCAGACCGGG	178 bp
		revers	CTTCCACTCTCCCGTTGCAT	
Mucin2	Muc2	forward	ACACTCGATACCCACCTGGA	180 bp
		revers	TGAAGTGTTGCCCCACTGTT	
ribosomal protein L15	Rpl15	forward	CTGACCCTGGATGTCTTGGTGC	
		revers	CCAAGCAGCCACTTCAGTGAACC	
	Smoc2	forward	GGAGCAGGGAAAGCAGATGAT	108 bp

2. Material und Methoden

Genname			Sequenz	Produktgröße
SPARC-related modular calcium-binding protein 2		revers	AACTTGCTCGGTCCAGAGTG	
Sucrase-Isomaltase	Sis	forward	GATGGGGAGGACACTGGTTG	163 bp
		revers	ATCCAACGAGCACAGAGGTG	
Synaptophysin	Syp	forward	TTTGCCATCTTCGCCTTTGC	172 bp
		revers	TAGTGCCCCCTTTAACGCAG	
Villin1	Vil1-1	forward	ATGACTCCAGCTGCCTTCTCT	437 bp
		revers	GCTCTGGGTTAGAGCTGTAAG	

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden auf Zellkulturgefäßen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig vom Zellwachstum wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt oder die Zellen mit geringerer Zellzahl auf ein neues Kultivierungsgefäß überführt. Für das Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin wurden die Zellen vom Kultivierungsgefäß abgelöst und mittels Zugabe von Medium die Trypsinisierung abgestoppt. Dann wurden die Zellen in der neuen gewünschten Zellzahl bzw. Konzentration in ein neues Gefäß überführt und im Inkubator kultiviert.

2.3.2 3D-Kultivierung von primären Krypten in Matrigel

Für die Kultivierung des Primärmaterials (murine intestinale Organoidkultur) wurden Zellen vom Projektpartner IGB Würzburg bereitgestellt. Die 3D-Kultivierung von Zellen ist die Kultivierungsstrategie, die der Physiologie am ähnlichsten kommt. Dafür wurde Matrigel (Corning, 354230) verwendet, welches reich an extrazellulären Matrixproteinen (ECM-Proteinen) ist und hauptsächlich aus Laminin, Kollagen 4, Heparin und anderen Wachstumsfaktoren zusammengesetzt ist. Somit konnten die Zellen sich in der komplexen Umgebung in alle Richtungen entfalten und differenzieren. Diese Krypten wurden im Stammzellmedium (Cat.-Nr. 06005) kultiviert. Die genaue Zusammensetzung des Mediums wird vom Hersteller Stemcell Technologies nicht offengelegt.

Für die Kultivierung in 3D-Umgebung wurde ein Zellpellet generiert, indem die kryokonservierten Krypten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut wurden. Die Zellsuspension wurde mit PBS in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, um das Einfriermedium vollständig von

2. Material und Methoden

den Zellen zu entfernen. Das entstandene Zellpellet wurde mit Matrigel vermischt und ca. 5-10 Krypten pro Well zusammen mit 50 µl Matrigel auf die 24-Wellplatte mit den *Cell Saver* Spitzen, die bei -20 °C gelagert wurden, pipettiert. Um eine möglichst geringe Blasenbildung zu gewährleisten, wurden diese abgeschnittenen Spitzen verwendet. Matrigel musste zuvor über Nacht im Kühlschrank auf Eis aufgetaut werden. Die Zell-Matrigel-Mischung wurde dann für ca. 15 min im Inkubator zum Festwerden angeregt. Danach wurden 500 µl Medium auf die Zell-Matrigel-Tropfen gegeben und die Zellen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Beim Splitten der Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 500µl Cell Recovery Solution (Corning, 354253) pro 24-Well, um das Matrigel auf Eis aufzulösen und die Zellen als Pellet zu erhalten. Die Tropfen wurden stark mit der Cell Recovery Solution resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde auf Eis für 1 h inkubiert und dann bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann erneut in Matrigel aufgenommen und wieder auf einzelne 24-Wells verteilt.

Zweidimensional kultivierte Zellen wurden auf die 2 h zuvor beschichteten Fibronektin/KollagenR Kulturgefäße überführt. Dafür wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und auf die Platten gegeben. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.3.3 Produktion von Lentiviren

Für die Produktion von Lentiviren wurden 4 Mio. HEK293T-Zellen pro mittlere Platte gezählt und ausgesät. Nach Anwachsen über Nacht erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mit den einzelnen Bestandteilen bzw. Helferplasmiden des Virus und der spezifischen Expressionskassette. Es wurden 5,2 µg gag/pol, 2 µg Rev, 3 µg VSVg und 6,8 µg der gewünschten Expressionskassette eingesetzt

Dafür wurden die einzelnen Plasmide mit einer 2,5 M CaCl₂-Lösung in HEBS-Puffer vermischt. Diese DNA-Mischung wurde dann tropfenweise unter Vortexen mit 300 µl HEBS vermischt und vorsichtig auf die Zellen mit frischem Medium gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert und am nächsten Tag erfolgte das Ernten des Überstandes mit einem Filter, der eine Porengröße von 0,45 µm aufwies. Die Lagerung des Überstandes erfolgte bei -80 °C. Der Überstand wurde anschließend getestet und für die Infektion der Zellen eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.3.4 Aufkonzentrierung der Lentiviren mit dem LentiX-Konzentrator

Die Aufkonzentrierung der Lentiviren wurde erreicht, indem der lentivirale Überstand mit dem Reagenz (Takara Clontech, 631231) zur Aufkonzentration vermischt wurden. Dafür wurden 1 ml Lenti-X Konzentrator mit 3 ml Überstand sanft vermischt und danach für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wurde für 45 min bei 1.500 x g zentrifugiert, wobei ein weißes Pellet entstand. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 300 µl gewünschtes Medium aufgelöst. Der nun 10-fach konzentrierte Virus konnte bei -70 °C gelagert oder für mögliche Infektionen sofort verwendet werden.

2.3.5 Infektionsdurchführung

Die Infektion der zwei- oder dreidimensional kultivierten murinen Darmepithelzellen erfolgte, sobald ausreichend viele Zellen gewachsen waren. Dafür wurden die Zellen aus dem Matrigel mit Cell Recovery Lösung herausgelöst und entweder für eine Woche in zuvor mit Fibronectin/KollagenR beschichteten Kulturgefäßen kultiviert oder direkt in 3D infiziert.

Nachdem die Zellen auf den beschichteten Platten angewachsen waren und sich bis zur annähernden Konfluenz vermehrt hatten, erfolgte die Infektion mit Lentiviren. Dafür wurde das Medium aus dem 24-Well abgesaugt und frisches Medium 1:1 vermischt mit Virusüberstand und 0,5 µl Polybren, hinzugegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert und am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Stammzell-Medium.

Für die Infektion in 3D-Umgebung wurden die Krypten aus dem Matrigel mit Cell Recovery Lösung entfernt. Nach der Zentrifugation wurde das erhaltene Zellpellet 1:1 mit frischem Medium (100 µl) und Virusüberstand (100 µl) mit 0,5 µl Polybren im Reaktionsgefäß über Nacht im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde durch Zentrifugation der lentivirale Überstand entfernt und das Zellpellet wieder in Matrigel resuspendiert. Die Zellen wurden dann erneut in den Matrigeltropfen auf die 24-Wellplatte gebracht und wuchsen nach einigen Wochen aus dem Matrigel heraus, sodass Klone gepickt und analysiert wurden.

2.3.6 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der amplifizierten Produkte wurden die erhaltenen Proben aus dem PCR-Cycler als negativ geladene Nukleinsäurefragmente nach ihrer

2. Material und Methoden

Wanderungsgeschwindigkeit und damit Größe aufgetrennt. Dabei wanderten größere DNA-Fragmente langsamer durch das Gel als kleine Fragmente. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Agarosegel mit 2,5 µl Midori-Green versetzt, da es mit der DNA interkaliert und somit unter UV-Licht sichtbar wird. Die Herstellung von 1 % Agarosegel erfolgte durch Erhitzen in TAE-Puffer. Durch einen eingesetzten Plastikkamm wurden Taschen gebildet, in denen die Proben aufgetragen wurden. Nach Abkühlen des Gels wurde der Plastikkamm entfernt und das Gel in die Gelelektrophoresekammer überführt. Danach wurden die Proben in die Taschen pipettiert und das beladene Agarosegel mit TAE-Puffer beschichtet. Als Größenstandard wurde der Hyperladder I von Bioline genutzt. Die Auftrennung erfolgt für 20 min bei 100 V. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit UV-Licht.

2.4 Charakterisierung der Darmepithelzellen

2.4.1 Kumulative Populationsverdopplung

Die kumulative Populationsverdopplung (PDL) wurde für jede generierte Zelllinie bestimmt. Dafür wurden die Zelllinien passagiert, sobald sie vollständige Konfluenz auf dem Zellkulturgefäß erlangten. Die Passagenanzahl gibt Auskunft darüber, wie oft die Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt wurden. Die kumulative Populationsverdopplung wurde mittels ATCC Animal Cell Culture Guide (ATCC 2014) berechnet (Formel 1). X_b stellt dabei die Zellzahl zu Beginn und X_e die Zellzahl am Ende der Kultivierungszeit dar. S steht für die anfängliche Populationsverdopplung.

Formel 1: Gleichung zur Berechnung der kumulativen Populationsverdopplung

$$PDL = 3.32 (\log X_e - \log X_b) + S$$

2.4.2 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Die Fixierung und Permeabilisierung wurde benötigt, um auch intrazelluläre Marker bei den durchflusszytometrischen Messungen nachzuweisen. Dafür wurden die Zellen in 100 µl BD Cytofix/Cytoperm- Lösung im 96-Wellformat für 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, der beispielsweise Saponin enthielt. Wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, wurde die Antikörperfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse zur phänotypischen Charakterisierung

Für die Analyse der typischen Marker von Darmepithelzellen wurden verschiedene Passagen und Oberflächenmarker untersucht. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst, da diese so stark an der Oberfläche haften, dass eine Ablösung mit EDTA-Lösung nicht möglich war. Die Zellen wurden mit PBS* resuspendiert und in eine konische 96-Wellplatte überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 200 x g für 5 min bei 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt und 50 µl des primären Antikörpers für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS* gewaschen und mit einem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS* gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Zellsuspension wurde dann in ein FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch vermessen. Die erhaltenen Daten wurden mittels des Programms FlowJo ausgewertet, wobei durch FSC/SSC gating Zellschrott, tote Zellen sowie Zellaggregate von der Analyse ausgeschlossen wurden.

2.4.4 Immunfärbung in 2D- und 3D-Kultivierung

Die Immunfärbung diente dem Nachweis und der Lokalisation bestimmter Strukturen, indem die spezifische Bindung von Antikörpern an ein bestimmtes Protein oder anderes Biomolekül ausgenutzt wurde. Um die generierten Zelllinien und auch die murinen intestinalen Kryptenkulturen zu charakterisieren wurden Epithelzellmarker wie Ecadherin und ZO-1 oder auch Zelltyp-spezifische Marker wie Mucin2 und Lgr5 angefärbt. Dafür wurden primäre Antikörper wie Ecadherin von Cell Signaling Technology und ZO-1 von Invitrogen, sowie Mucin2 von Thermo Fisher genutzt.

Für die zweidimensionale Untersuchung wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und fast bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen, um Medienreste vollständig zu entfernen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd. Danach wurde dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 0,5 % TritonX für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Es wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml 0,1 % Saponin-Lösung für 15 min blockiert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem in 0,1 % Saponin-gelösten primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Dafür wurden 50 µl des Antikörpers auf einen Parafilm pipettiert und das Glasplättchen mit den Zellen darauf positioniert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h im

2. Material und Methoden

Dunkeln bei Raumtemperatur. Es handelte sich um Cy3-markierte Antikörper, die wieder über Parafilm mit den Zellen inkubiert wurden. Die Antikörper wurden 1:100 eingesetzt und in 0,1 % Saponin-Lösung angesetzt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde mit MilliQ-Wasser gespült und die Proben mittels Fluoroshield mit DAPI eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Für die Immunfärbung der murinen intestinalen Kryptenkulturen mussten die Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben aus dem Matrigel herausgelöst werden. Die Zellen wurden mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) für ca. 10 min fixiert. Die Suspension wurde mit 1 ml PBS verdünnt und erneut für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen wurde mit dem Primärantikörper (Ecadherin 1:200 und ZO-1 1:100) für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl Antikörper in Saponin-Lösung pro Ansatz verwendet. Danach wurde die Probe erneut mit 1ml PBS verdünnt und für 5min bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Sekundärantikörper (Anti rabbit Cy3 1:500 und Anti rabbit FITC 1:100) und der direkt-markierte Epcam-PE-Antikörper (1:100) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es wurden 200 µl Antikörper verwendet. Die Proben wurden dann mit 1 ml PBS verdünnt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurde kurz mit MilliQ-Wasser gespült und 25 µl der Zellsuspension auf die Kammer übertragen. Es wurde Fluoroshield mit DAPI auf die Zellen getropft und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank getrocknet.

2.4.5 Analyse des Transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Der transepitheliale Widerstand diente der Messung der Barrierefunktion einer Zellschicht. Die Zellen wurden dafür auf ein Transwell ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz wurde ein Widerstand gemessen, der Auskunft über die Dichte der Barriere gab. Die einzelnen Zellen wurden über *tight junctions* bzw. dichte Zell-Zell-Kontakte eng miteinander verbunden, sodass somit die Zellzwischenräume verschlossen wurden und es zur Ausbildung einer parazellulären Diffusionsbarriere kam. Diese Dichtheit wurde mittels TEER quantifiziert. Die Messung erfolgte über das EVMOX Volttohmmeter und die EndOhm Messkammer (World Precision Instruments). Dafür wurden 100.000 Zellen pro Transwell (Corning 0,3 µm Polycarbonatmembran) ausgesät und über mehrere Tage kultiviert und vermessen. Die Messungen wurden in

2. Material und Methoden

Duplikaten durchgeführt, wobei daraus Mittelwerte gebildet wurden. Diese Mittelwerte wurden dann pro Fläche berechnet und im Diagramm aufgetragen.

2.4.6 Serotonin-ELISA

Zum quantitativen Nachweis von Serotonin wurde der Enzymimmunoassay (ABNOVA, KA1894) verwendet. Zuerst wurde Serotonin quantitativ acetyliert. Das Antigen bindet an die feste Phase der Mikrotiterplatte. Nachdem sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte, wurden durch Waschen das freie Antigen und freie Antigen-Antiserum-Komplexe entfernt. Der an die Festphase gebundene Antikörper wurde durch einen Anti-rabbit IgG-Peroxidasekonjugat mittels Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat detektiert. Die Reaktion wurde bei 450nm detektiert.

Zuerst wurden 25 µl des Zellkulturüberstandes mit 500 µl Acylierungspuffer und 25 µl Acylierungsreagenz vermischt und inkubiert für 15 min bei Raumtemperatur. 25 µl der acylierten Proben wurden auf die Serotonin-Mikrotiterstreifen pipettiert. Dazu wurden 100 µl des Serotonin-Antiserums gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Streifen viermal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 100 µl Konjugat in jedes Well pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit 200 µl Waschpuffer, wurde 100 µl Substrat auf die Wells gegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nachdem 100 µl Stopplösung hinzugegeben wurde, wurde die Platte innerhalb von 10 min mittels Platereader (TECAN, Sunrise) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm vermessen.

2.4.7 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde von Prof. Dr. Manfred Rohde in der Zentralen Einheit der Mikroskopie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung durchgeführt. Die generierten Zelllinien wurden zuvor zweidimensional oder im Transwellssystem für mindestens eine Woche bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Somit sollten Unterschiede in der Topologie der Zellen ermittelt werden. Für die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Proben mit 2 % Glutaraldehyd fixiert und mit einem Aceton-Gradienten dehydriert. Nachdem der kritische Punkt beim Trocknen mit CO₂ erreicht wurde und die Sputterbeschichtung mit Gold-Palladium erfolgte, wurden die Proben mittels Zeiss Merlin bei einer Spannung von 5 kV mit einem Everhart-Thornley SE-Detektor und einem Inlens SE-Detektor in einem Verhältnis von 25:75 aufgenommen. Weiterhin wurden einzelne Klone in Zusammenarbeit mit Dr. Julia

2. Material und Methoden

Horstmann und Prof. Dr. Theresia Stradal auch auf standardisierter 2D-Kultivierung mit Rasterelektronenmikroskopie angeschaut.

2.4.8 Alcianblau-Färbung

Die Anfärbung von sauren Mucinen bzw. Proteoglykanen und Polysacchariden erfolgte mit Alcianblau- Lösung. Um eine Gegenfärbung der Zellkerne zu erhalten, wurde mit Kernechtrot-Lösung gearbeitet. Für die Färbung wurde zuerst für 10 min mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) oder 4 % Histofix oder für 1-2 h mit Carnoy-Lösung fixiert (Tabelle 22).

Tabelle 22: Zusammensetzung der verschiedenen Fixierungslösungen

Fixierung	Zusammensetzung
Methanol/Aceton	50 % Methanol
	50 % Aceton
4 % Paraformaldehyd	in PBS (Fertiglösung)
Carnoy	60 % Ethanol
	30 % Chloroform
	10 % Eisessig

Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und ein saurer pH-Wert für 5 min mit 3 % Essigsäure eingestellt. Die Färbung mit 1 % Alcianblau-Lösung erfolgte für 2-3 h bei Raumtemperatur. Überschüssige Färbelösung wurde über mehrmaliges Waschen mit 3 % Essigsäure entfernt. Anschließend wurde einmal mit MilliQ-Wasser gewaschen und 5 min mit 0,1 % Kernechtrot-Fertiglösung (Merck, 1001210500) die Zellkerne gegengefärbt. Im Anschluss wurden die Mucus-gefärbten Zellen mittels Mikroskop analysiert.

2.4.9 Infektion mit Enteropathogenen *E. coli* (EPEC)

Um die Anwendbarkeit der generierten Zelllinien zu verdeutlichen wurden Infektionsversuche in Zusammenarbeit mit Sabrina Mühlen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen auf Transwells ausgesät und eine Woche kultiviert, sodass diese einen TEER ausbildeten. Danach sollte durch die Infektion mit EPEC die ausgebildete Barriere zerstört werden. In mehreren Wiederholungen wurden exemplarisch Klone mit einer Mutante E69 Δ escN infiziert. Diese Mutante besitzt kein Typ3-Sekretionssystem und ist somit nicht in der Lage erfolgreich *tight junctions* aufzulösen. Zur Darstellung der Infizierbarkeit einzelner Klone wurde gleichzeitig mit einem Wildtypstamm E2348/69 infiziert, der die dichten Zell-Zell-Kontakte mittels Typ3-

2. Material und Methoden

Sekretionssystem auflöst. Das Typ3-Sekretionssystem dient der Infektion von eukaryotischen Zellen, indem die bakteriellen Proteine über eine Nadelstruktur in die Wirtszelle gebracht werden. Somit bedeuten Mutationen im Typ3-Sekretionssystem oft den Verlust der Infektionsfähigkeit der gramnegativen *E. coli* Bakterien.

Für den Infektionsversuch wurde 2 h vor der Zugabe der Bakterien das Medium gewechselt und dabei FCS entfernt, da dieser Medienbestandteil das Wachstum der Bakterien hemmt. Somit konnten sich die Zellen an das frische Medium anpassen und ein Wert 0 generiert werden. Nachdem das Medium gewechselt wurde, wurden 50 Mio. Bakterienzellen pro Well zur Infektion zugegeben. Über mehrere Stunden wurde der transepitheliale Widerstand gemessen. Anschließend wurden die Zellen mittels 4 % Paraformaldehyd fixiert und über Immunfärbung auf ZO-1 analysiert, um eine Visualisierung des *tight junction*-Signales zu erhalten.

3. Ergebnisse

3.1 Kultivierung und Charakterisierung der murinen intestinalen Organoide

Die murinen intestinalen Krypten wurden zur Kultivierung und Immortalisierung vom Projektpartner bereitgestellt. Zunächst wurden kryokonservierte murine intestinale Kryptenkulturen aus Lgr5-positiven C57BL/6-Mäusen aufgetaut und nach dem Protokoll aus dem Labor von Hans Clevers kultiviert (Sato et al. 2011). Die Zellen wurden mittels Matrigel in eine 3D-Umgebung gebracht, sodass die Organoide möglichst komplexe Strukturen mit ausdifferenzierten Zellen ausbildeten. Zu Beginn der Kultivierung waren hauptsächlich Einzelzellen zu erkennen, die nach einigen Tagen zu runden Organoid-Strukturen differenzierten (Abbildung 3). Im nächsten Schritt bildeten sich am Rand des Organoids kleine Einkerbungen, die nach weiterer Differenzierung zu komplexen Ausstülpungen wurden. Dies deutet daraufhin, dass im äußeren Bereich des Organoids die Stammzellen sitzen, die in der Lage sind in die anderen Zelltypen des Dünndarms zu differenzieren. Dabei entstanden Ausstülpungen, die mit verlängerter Kultivierung deutlich ausgeprägter wurden. Wie zuvor von Sato et al. 2009 beschrieben waren die Krypten nach ca. 2 Wochen Kultivierung ausdifferenziert und es entstanden sehr komplexe Darmkrypten, wobei aus dem ursprünglich runden Rand des Organoids starke Ausstülpungen und gewundene Krypten-Strukturen hervorgingen.

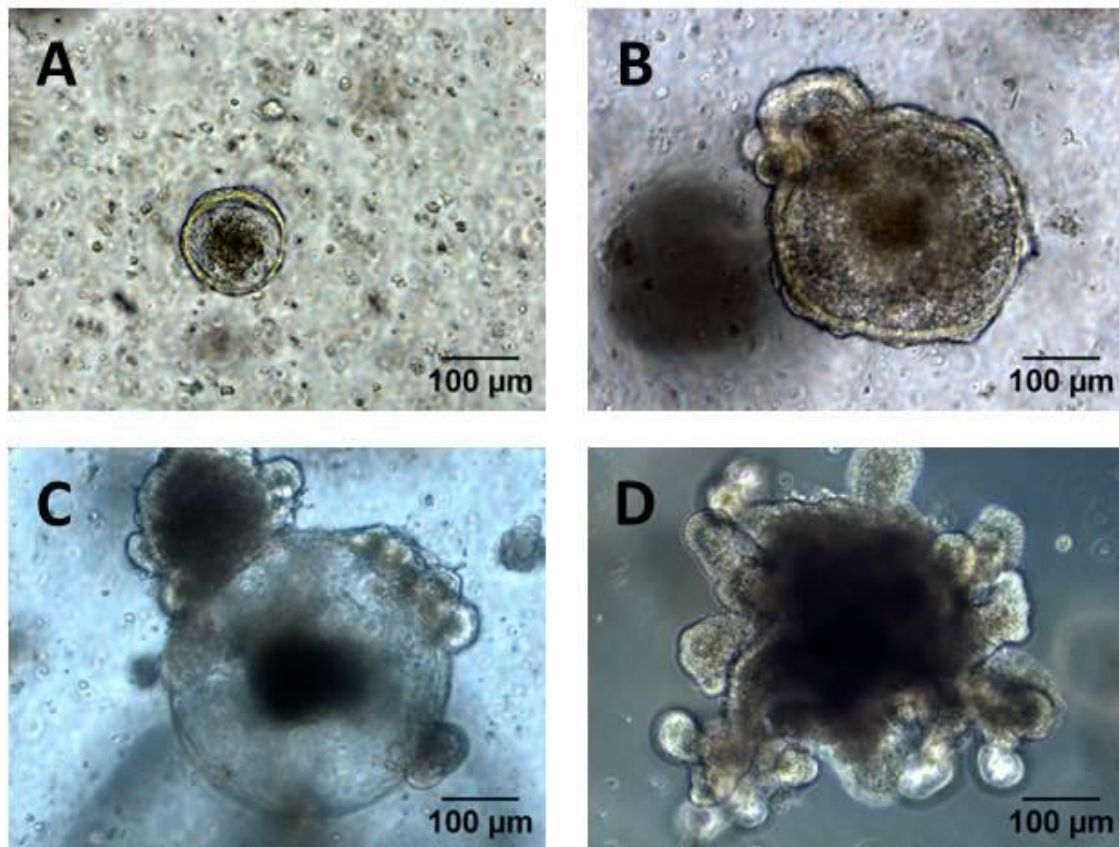


Abbildung 3: Entstehung der komplexen Krypten-Struktur.

Die aufgetauten Krypten wurden in Matrigel aufgenommen und über mehrere Wochen kultiviert. (A) Zu Beginn der Kultivierung waren viele Einzelzellen im Matrigel vorhanden. Nach einigen Tagen bildeten sich kleine Organoiden, die jedoch keine Ausstülpungen am Rand zeigten. (B, C) Nach weiterer Kultivierung waren Einkerbungen am Rand des Organoids zu erkennen, die im nächsten Schritt zu Ausstülpungen differenzierten. (D) Im letzten Schritt war eine deutliche Krypten-Struktur mit vielen Ausstülpungen zu erkennen, wobei davon ausgegangen werden kann, dass die Stammzellen zu den anderen intestinalen Zelltypen ausdifferenziert waren.

Um sicher zu gehen, dass alle Zelltypen des Dünndarms in den murinen intestinalen Kryptenkulturen vertreten waren, wurde RNA von den primären murinen intestinalen Kryptenkulturen geerntet und auf Zelltyp-spezifische Marker analysiert. Um unspezifische Banden auszuschließen, wurden die Marker auch mithilfe einer bereits in Vorarbeiten etablierten murinen intestinalen Zelllinie (IEC) untersucht. Bei den murinen IECs handelt es sich um eine Epithelzelle aus dem embryonalen murinen Dünndarm, die zuvor von InSCREENex generiert wurde (Schwerk et al. 2013). Für die Genexpressionsanalyse wurden typische Marker für die verschiedenen Zelltypen analysiert, die in Tabelle 23 zusammengefasst und den jeweiligen Zelltypen zugeordnet wurden.

3. Ergebnisse

Tabelle 23: Einordnung der verschiedenen Marker zu den unterschiedlichen Zelltypen des Dünndarmepithels

Epithelzellen	Ocln	Cldn1	Cldn5	Tjp-1	Epcam	Cdh1	Cldn4	Cdx2
Enterozyten	Slc40a1	Heph1	Heph2	Heph3	Heph4	Vil1	Sis	Mgam
Stammzellen	Lgr5	Smoc2	Hopx2	Hopx3				
enteroendokrine Zellen	Slc6a4	Syp	Chga					
Panethzellen	Lyz1	Lyz2	Nod2					
Gobletzellen	Tff3	Muc2						

Für die Analyse der Epithelzellen wurden verschiedene Marker ausgewählt. *Tight junction* Proteine wie z.B. Occludin und verschiedene Claudine kommen vermehrt im Epithel vor. Auch das epitheliale Adhäsionsmolekül Epcam oder Ecadherin werden typischerweise in den Epithelzellen exprimiert. Cdx2 wird im Zellkern von intestinalen Epithelzellen gebildet.

Marker für Enterozyten sind verschiedene Membrantransportproteine wie z.B. Ferroportin (Slc40a1), welches an basolateraler Seite der Epithelzellen liegt und somit Eisen in das Blut transportiert. Darüber hinaus befindet sich Hephästin als Membranprotein auf den Enterozyten, wobei das importierte Eisen am Membranprotein/Enzym zum Export mit Ferroportin vorbereitet wird und somit essentiell für die Eisenaufnahme durch den Darm ist. Das Protein Villin, welches in den Mikrovilli des epithelialen Bürstensaums vorkommt und weitere Enzyme wie z.B. Sis, welches die Spaltung von Mehrfachzuckern katalysiert und Maltase-Glucoamylase (Mgam), welches den Abbau von Zweifachzuckern beschleunigt, sind typische Marker für absorptive Enterozyten.

Stammzellen zeichnen sich durch die Expression des Rezeptors Lgr5, Smoc2, Hopx2 und Hopx3 aus. Lgr5 ist als Rezeptor für R-Spondin bekannt. Smoc2 (SPARC related modular calcium binding 2) inhibiert den BMP (Bone Morphogenic Protein) -Signalweg (Thomas et al. 2009) und dafür wird Noggin benötigt, um die intestinalen Organoidkulturen zu erhalten (Sato et al. 2009).

Enteroendokrine Zellen können Hormone wie z.B. Serotonin sekretieren und benötigen dafür den Serotonin-Transporter Slc6a4. Außerdem sollte dieser Zelltyp des Darms Synaptophysin und ChromograninA exprimieren.

Typisch für Becher- bzw. Gobletzellen ist die Expression von Tff3, welches die Mucusschicht stabilisiert und auch die Erneuerung des Epitheliums fördert. Mucin2 wird zur Bildung des Mucus benötigt und schützt das Epithel vor eindringenden Pathogenen.

Panethzellen weisen die Marker Lysozym1 und Lysozym2 auf, wobei dieses Enzym der Abwehr von Bakterien dient. Der Rezeptor für Fremdstoffe Nod2 wird vermehrt auf

3. Ergebnisse

intestinalen Epithelzellen wie den Panethzellen exprimiert und dient der Erkennung von bakteriellen Dipeptiden, um antimikrobielle Peptide wie Lysozym und Defensin zu sekretieren.

In den murinen intestinalen Krypten wurden einige Zelltyp-spezifische Marker nachgewiesen. Epithelzellmarker wie z.B. Cdx2, Ecadherin (Cdh-1), Epcam, *Tight junction* Protein-1 (Tjp-1), Occludin (Ocln) wurden nachgewiesen. Marker für Enterozyten wie Villin1 (Vil1), Hephästin1 (Heph1) und Ferroportin (Slc40a1) sowie der Stammzellmarker Lgr5 wurden mittels PCR-Analyse gezeigt.

Auch für enteroendokrine Zellen wurde ein schwaches Signal für ChromograninA und den Serotonin-Transporter Slc6a4 beobachtet. Die typischen Marker für Becherzellen Tff3 und Muc2 wurden deutlich exprimiert. Lysozym2 wurde als Panethzellmarker gezeigt (Abbildung 4).

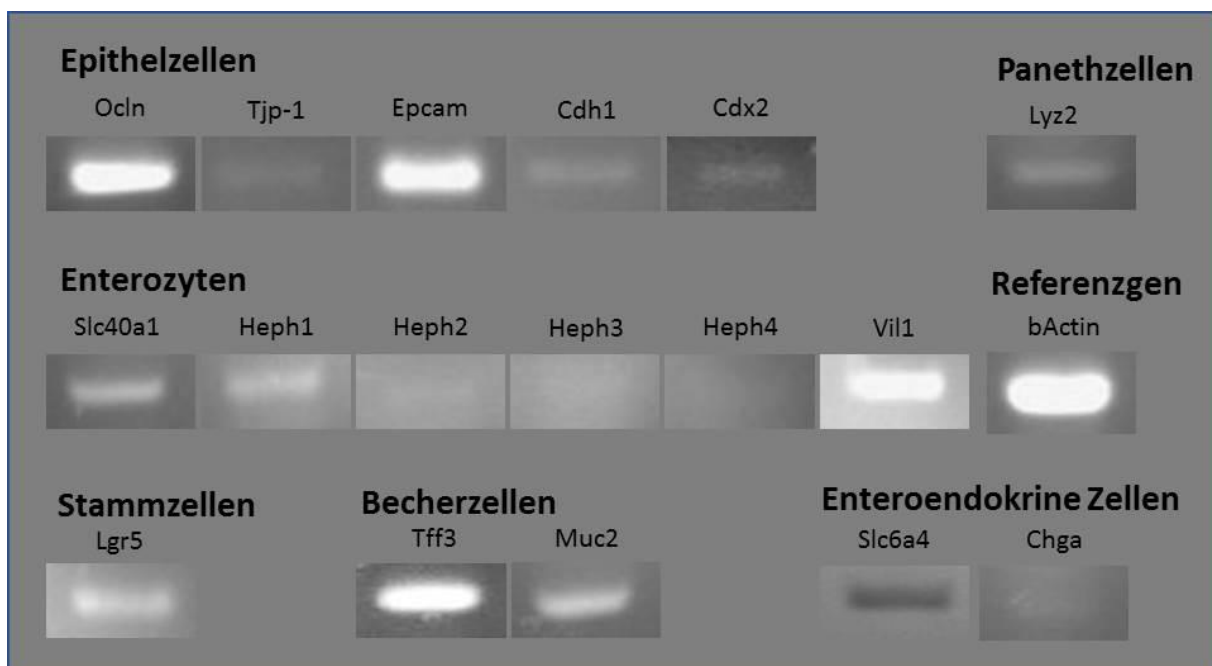


Abbildung 4: Expression verschiedener Zelltyp-spezifischer Marker auf mRNA-Ebene zur Charakterisierung der murinen intestinalen Organoide.

Zur Analyse verschiedener Marker wurde die RNA von ausdifferenzierten Krypten nach zwei Wochen Kultivierung geerntet und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde verwendet, um Zelltyp-spezifische Marker mittels PCR nachzuweisen. Für die murinen intestinalen Krypten wurden Epithelzellmarker wie z.B. Occludin (Ocln), *tight junction* Protein (Tjp-1), Epcam und Ecadherin (Cdh1) nachgewiesen. Außerdem wurde die Expression der Enterozyten-Marker wie Ferroportin (Slc40a1), Hephästinen (Heph1-Heph4) und Villin1 (Vil1) mittels PCR belegt. Auch der Stammzellmarker Lgr5 wurde über PCR in den murinen intestinalen Krypten gezeigt. Marker für die sekretorischen Zelltypen (enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Panethzellen) wie z.B. der Serotonintransporter (Slc6a4) und ChromograninA (Chga), Tff3 und Mucin2 (Muc2), sowie Lysozym2 (Lyz2) wurden in den murinen intestinalen Organoidkulturen exprimiert. Als Referenzgen diente das *Housekeeping* Gen bActin.

3. Ergebnisse

Um nicht nur eine qualitative Aussage über die Expression einiger Zelltyp-spezifischer Marker zu bekommen, sondern auch Expressionshöhen einzuordnen bzw. eine quantitative Einschätzung vorzunehmen, wurde die geerntete RNA auch in einer qRT-PCR analysiert. Dafür wurde als Negativkontrolle die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 verwendet, um unspezifische Produkte auszuschließen. Weiterhin wurden als Kontrollzelllinie die murinen IECs (Schwerk et al. 2013) verwendet, um eine Einordnung der Expressionshöhen im Vergleich zu einer anderen Zelllinie zu erhalten. Charakteristische Marker für das murine Primärmaterial der intestinalen Kryptenkultur sind die Enterozyten-Marker *Sis* und *Mgam*, die Enzyme zur Verdauung von Kohlenhydraten darstellen. *Villin1* diente der Analyse von Mikrovilli, die zur Oberflächenvergrößerung und damit verbesserten Resorption benötigt werden. Außerdem wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül *Epcam* als typischer Epithelzellmarker untersucht. Weiterhin wurden die Stammzellmarker *Lgr5* und *Smoc2* sowie *Mucin2* zum Nachweis der Genexpression von Mucus, analysiert.

Aus der qRT-PCR Analyse ging hervor, dass alle analysierten Marker (*Epcam*, *Sis*, *Mgam*, *Lgr5*, *Smoc2*, *Mucin2*, *Villin1*) nachweisbar waren (Abbildung 5). Wohingegen die murine Kontrollzelllinie IEC eine geringe Expression von *Epcam* zeigte. Nach erfolgter Amplifizierung wurden die entstandenen Produkte auf ein Gel aufgetragen, um die Spezifität zu bestimmen. Im oberen Teil der Abbildung 5 ist zu erkennen, dass die murinen intestinalen Krypten für fast alle untersuchten Marker (außer *Mucin2*) eine Expression zeigten. Im unteren Teil der Abbildung 5 zeigt die quantitative Auswertung, dass die murinen intestinalen Organoidkulturen eine höhere Expression von *Epcam*, *Sis*, *Mgam*, *Lgr5*, *Smoc2*, *Muc2* und *Villin1* aufwiesen als die Vergleichszellen der murinen intestinalen Epithelzellen (IECs) und NIH 3T3. Es wurde demnach keine eindeutige Expression der verschiedenen Gene in den murinen IECs sowie der Kontrollzelllinie NIH 3T3 nachgewiesen.

Die Genexpression zwischen den Zellen war vergleichbar, da das *Housekeeping* Gen *bActin* für die murinen intestinalen Kryptenkulturen, IECs und NIH 3T3 die gleiche Expressionshöhe zeigte. Für die Auswertung der durchgeführten qRT-PCR wurden die Expressionshöhen zum NIH 3T3 Material normiert. Die primären Krypten und die murinen IECs exprimierten sowohl das Zelladhäsionsmolekül *Epcam* als auch *Villin1* höher als die murinen NIH 3T3-Zellen. Jedoch zeigten die murinen intestinalen Krypten eine höhere Expression als die IECs und auch verglichen mit den anderen untersuchten Genen wurden *Epcam* und *Villin1* am stärksten exprimiert. Für die

3. Ergebnisse

anderen Marker (Sis, Mgam, Lgr5, Smoc2 und Mucin2) wurde eine eindeutige Expression für die primären murinen intestinalen Kryptenzellen nachgewiesen. Weiterhin wurden die Verdauungsenzyme Sis und Mgam höher exprimiert als die Stammzellmarker (Lgr5 und Smoc2) und der Becherzell-Marker Muc2. Dies deutete daraufhin, dass Enterozyten vermehrt in den Krypten vorkamen und somit die Enterozytenmarker (Epcam, Villin1, Sis und Mgam) verstärkt nachgewiesen wurden.

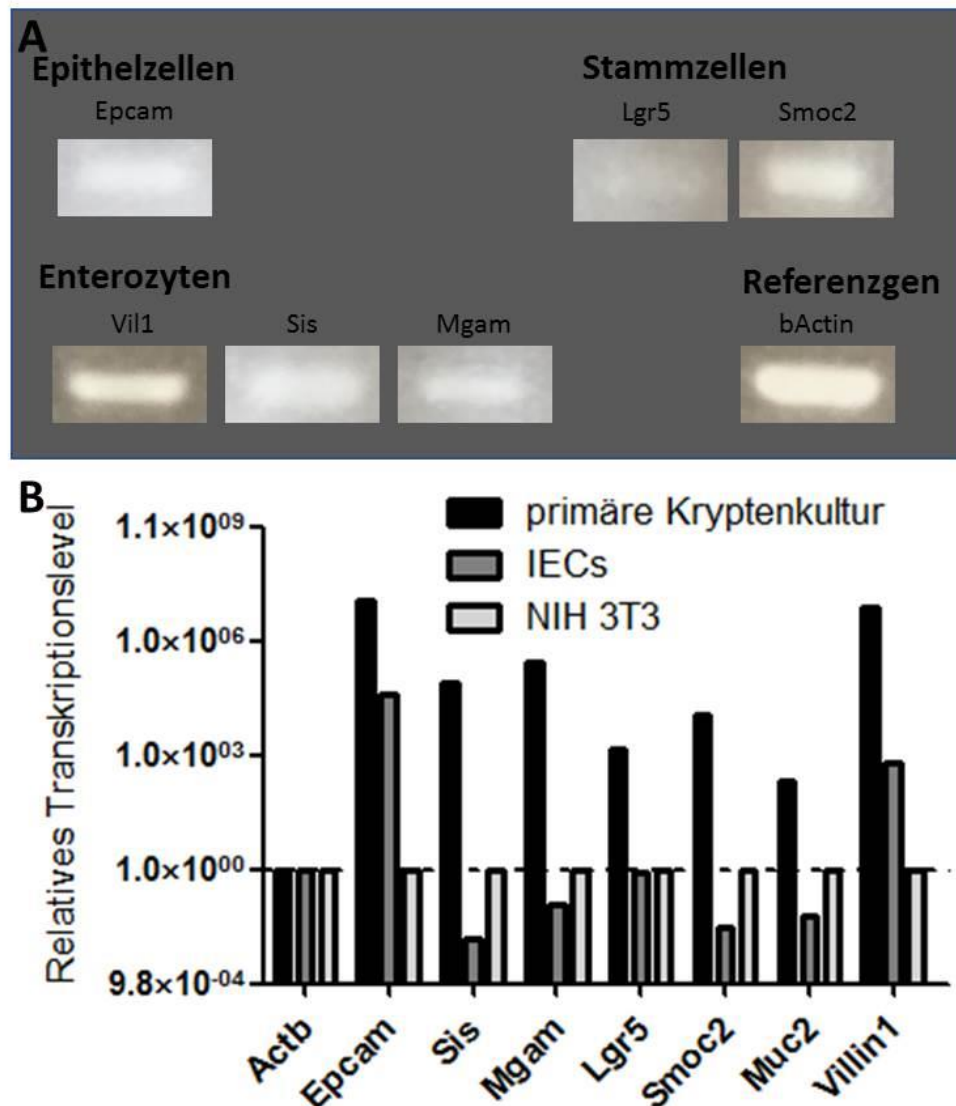


Abbildung 5: Quantitative Analyse Zelltyp-spezifischer Marker der murinen intestinalen Organoidkulturen mittels qRT-PCR.

Die RNA wurde aus den dreidimensional kultivierten primären Kryptenkulturen und den zweidimensional kultivierten Kontrollzelllinien IECs und NIH 3T3-Zellen geerntet. Mit der daraus generierten cDNA wurden Zelltyp-spezifische Marker (Epcam, Sis, Mgam, Villin1 für Enterozyten, Lgr5, Smoc2 für Stammzellen und Muc2 für Becherzellen) analysiert, um eine Einschätzung der vorhandenen Zelltypen in den murinen intestinalen Organoidkulturen zu erhalten.

3. Ergebnisse

Eine zentrale Rolle in der Organoid-Technologie spielen die Stammzellen, die in der Lage sind in alle anderen Zelltypen (Panethzellen, enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Enterozyten) des Dünndarms zu differenzieren. Aus diesem Grund wurden zunächst die Lgr5-positiven Stammzellen kultiviert, sodass verdeutlicht wurde, wo die intestinalen Stammzellen in den Organoid-Strukturen aufzufinden waren. Dafür wurde auf intestinale Kryptenkulturen zurückgegriffen, die von Lgr5-positiven C57BL/6-Mäusen generiert wurden, bei denen eine GFP-Expression mittels eines Lgr5-Promotors in den Stammzellen erfolgte (Abbildung 6). Somit wurde verdeutlicht, wo die Stammzellen in den Organoiden bzw. Krypten lokalisiert waren. Es war zu erkennen, dass die Stammzellen sich in den Organoiden im äußeren Bereich befanden. In den differenzierten Ausstülpungen wurde deutlich, dass auch hier die Stammzellen in der unteren Nische zu finden waren. Für die genauere Charakterisierung der murinen intestinalen Organoiden wurden die Krypten auf bestimmte Marker untersucht und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Als spezifischer Epithelzellmarker wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül Epcam und das transmembran-ständige Adhäsionsprotein Ecadherin ausgewählt. Es ging hervor, dass Epcam und Ecadherin von allen Zellen auf der gesamten Oberfläche exprimiert wurden. Weiterhin wurde das *tight junction* Protein ZO-1 angefärbt, welches ausschließlich auf der inneren Seite des Lumens exprimiert wurde. Aus diesem Grund war eine deutliche Ausrichtung der Zellen in apikale und basolaterale Richtung zu erkennen.

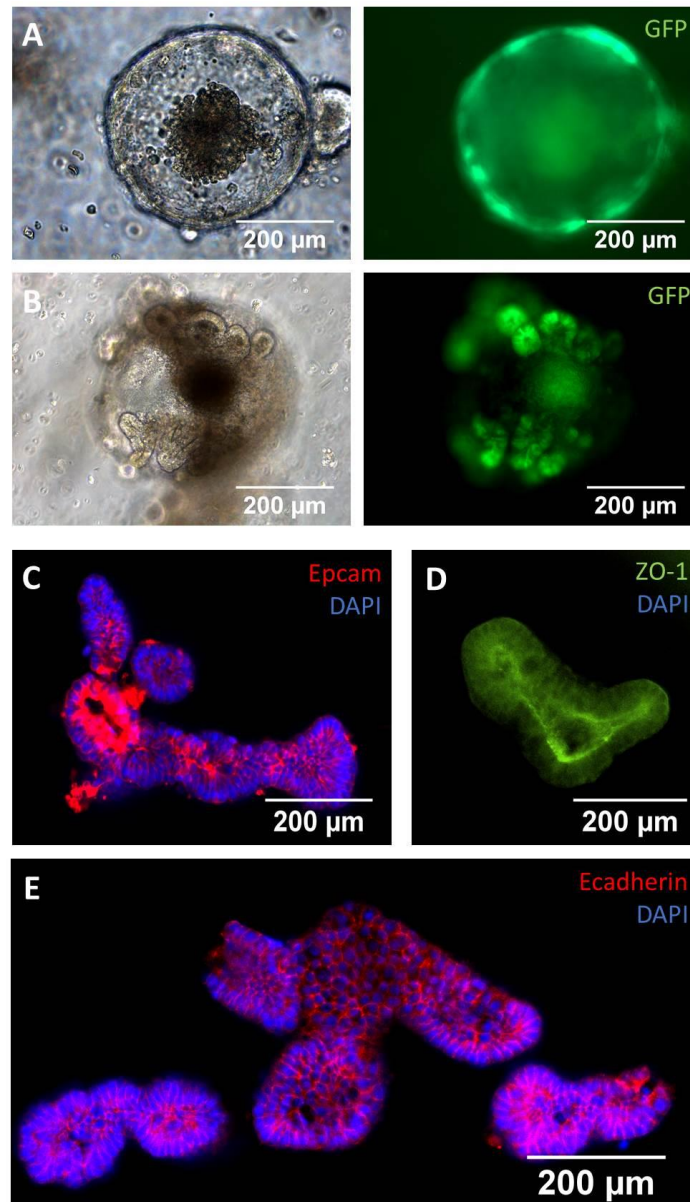


Abbildung 6: Charakterisierung der intestinalen Kryptenkulturen.

Zur Darstellung der murinen intestinalen Stammzellen wurden die GFP-positiven Lgr5-GFP-Krypten aus Lgr5-positiven C57BL/6-Mäusen für eine Woche in Matrigel kultiviert. Die GFP-Expression wurde in den Stammzellen durch den Lgr5-Promotor gesteuert. Für die Immunfluoreszenz wurden murine intestinale Krypten aus Lgr5-positiven C57BL/6-Mäusen verwendet. Die Zellen wurden aus dem Matrigel herausgelöst und mit den spezifischen Antikörpern auf das epitheliale Zelladhäsionsmolekül Epcam, *tight junction* Protein ZO-1 und das Adhäsionsprotein Ecadherin angefärbt. **(A)** Nach einer Woche Kultivierung der murinen intestinalen Organoiden, bildeten die Zellen Sphäroide aus, wobei die Stammzellen in der äußeren Umrandung lagen. Dies war an der GFP-Expression zu erkennen. **(B)** Nach zwei Wochen Kultivierung der murinen intestinalen Organoidkulturen differenzierten die Stammzellen, wobei diese dann im unteren Bereich der Ausstülpungen lagen. **(C, D, E)** Für die genauere Charakterisierung der murinen intestinalen Kryptenkultur wurden die ausdifferenzierten Krypten mit Methanol/Aceton fixiert und auf verschiedene Epithelzellmarker wie Epcam **(C)**, ZO-1 **(D)** und Ecadherin **(E)** mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Dafür wurden die Zellen für 90 min mit den spezifischen Primärantikörpern inkubiert und danach für 60 min mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. Danach wurden die Krypten auf eine Fluoreszenz-Kammer überführt und über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Zur Verdeutlichung der Zellkerne wurden diese mit DAPI angefärbt.

3.2 Optimierung der Transduktion und Immortalisierung in 2D und 3D

Zunächst wurden die Zellen über einige Wochen kultiviert, um möglichst ausdifferenzierte Krypten-Strukturen zu erhalten (Abbildung 7). Als Strategie zur Immortalisierung wurden zwei verschiedenen Kultivierungsmethoden verwendet. Zum einen wurden die Zellen nach der Transduktion direkt wieder in Matrigel ausgesät, sodass die Zellen weiterhin differenzieren konnten und möglichst *in vivo* ähnlich kultiviert wurden. Zum anderen wurden die Zellen nachdem sie aus dem Matrigel isoliert wurden an die 2D-Kultivierung adaptiert und anschließend transduziert.

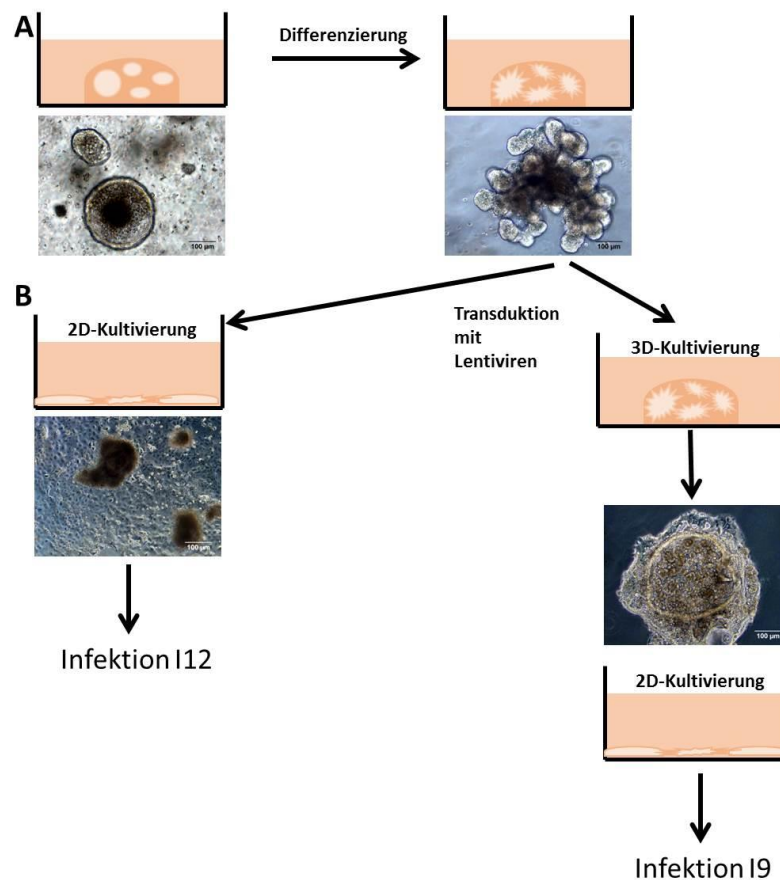


Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Immortalisierungsstrategien in 2D- und 3D-Kultivierung.

(A) Zu Beginn der 3D-Kultivierung bildeten die murinen Darmzellen Sphäroide aus, die als runde Organoide wuchsen. Nach ca. zwei Wochen Kultivierung differenzierten die Stammzellen in unterschiedliche Darmepithelzellen wie z.B. Panethzellen, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Enterozyten. Dadurch entstanden die komplexen Krypten-Strukturen, wobei deutliche Ausstülpungen sichtbar wurden. **(B)** Dieses Stadium wurde genutzt, um die möglichst differenzierten Zellen an eine 2D-Kultivierung zu adaptieren. Damit sollten möglichst unveränderte Zellen immortalisiert werden. Daraus entstanden zwei verschiedene Infektionen (I9 und I12), die erfolgreich zu immortalisierten Klonen führten. Für die Infektionen wurden die Zellen vor der lentiviralen Transduktion zweidimensional ausgesät. Bei der Infektion I12 wurden die Zellen zweidimensional nach der lentiviralen Transduktion kultiviert und im Gegensatz dazu wurden die Zellen aus der Infektion I9 nach der lentiviralen Transduktion in 3D kultiviert. Danach wurden Klone gepickt, die aus dem Matrigel herauswuchsen.

3. Ergebnisse

Um die Zellen, welche in den Kryptenkulturen dreidimensional kultiviert wurden, an eine 2D-Kultivierung zu adaptieren, wurden verschiedene Beschichtungen der Zellkulturgefäße mit ECM-Proteinen evaluiert. Diese Beschichtungen sollten eine verbesserte Adhäsion und Proliferation der Zellen ermöglichen. Dafür wurden die Zellen aus dem Matrigel herausgelöst und auf verschiedenen Beschichtungen wie z.B. einer Mischung aus Fibronectin/KollagenR, Gelatine, KollagenR, und KollagenG kultiviert (Abbildung 8). Dabei wurde deutlich, dass Kollagene besser zur Beschichtung der Kultivierungsgefäße geeignet waren als beispielsweise denaturierte Kollagene wie Gelatine. Bei der Beschichtung mit Gelatine wuchsen weniger Zellen an. Aufgrund des besseren Wachstums wurde eine Kombination aus KollagenR/Fibronectin (Abbildung 8, grüne Umrandung) zur Beschichtung der Kulturgefäße zu verwendet.

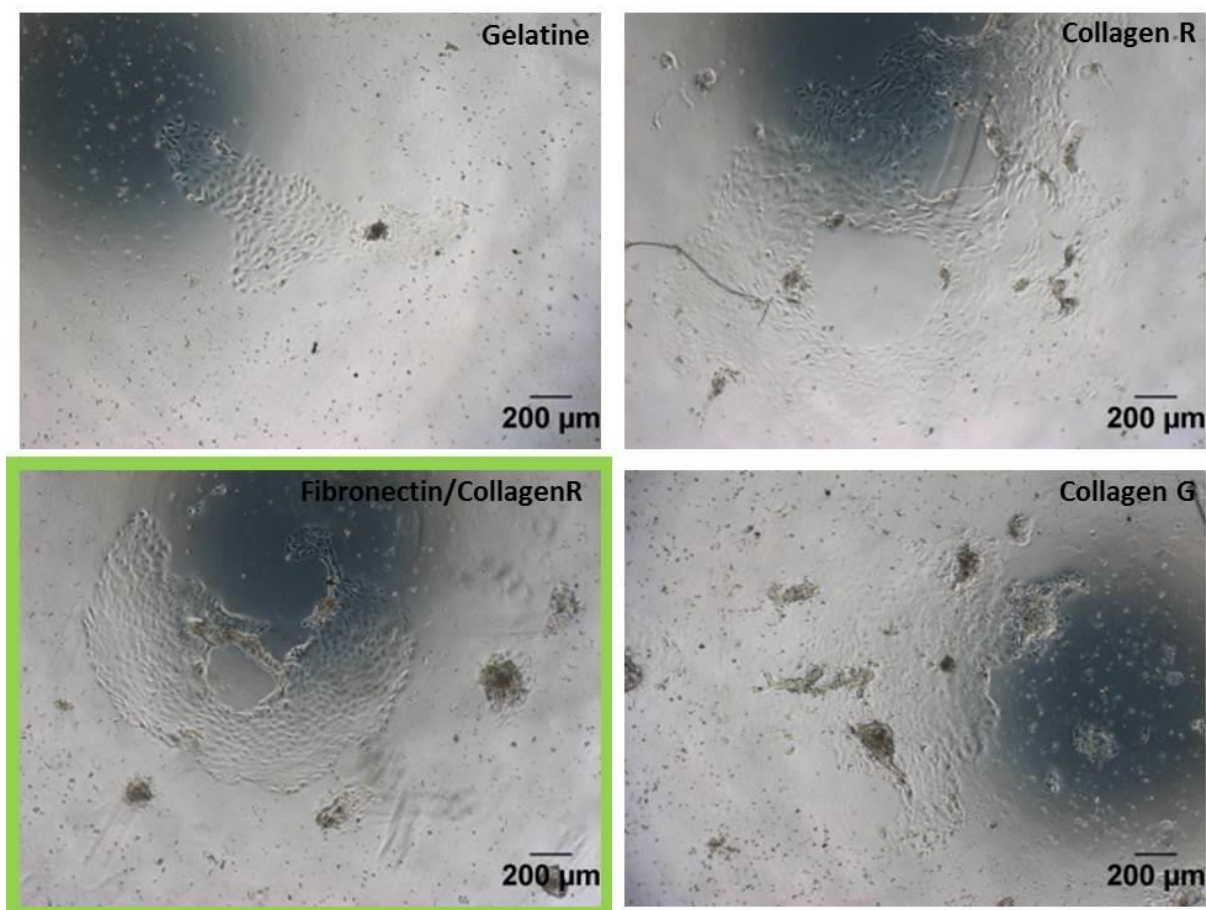


Abbildung 8: Optimierung der Beschichtung der Zellkulturgefäße.

Die murine intestinale Kryptenkultur wurde aus der ursprünglichen 3D-Umgebung herausgelöst und auf verschiedenen Bedingungen ausgesät, um die bestmögliche Kultivierungsstrategie für die 2D-Kultivierung herauszufinden. Es wurden vier unterschiedliche Beschichtungen (0,5 % Gelatine, KollagenR, Fibronectin/KollagenR und KollagenG) für die Kultivierungsgefäße getestet.

Zusätzlich wurden auch unterschiedliche Medien getestet, um die optimalen Kultivierungsbedingungen zu ermitteln (Abbildung 9). Um ein möglichst breites

3. Ergebnisse

Spektrum an verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und Hormonen zu untersuchen, wurden die Krypten mit 6 unterschiedlichen Medien kultiviert und untersucht, ob die Zellen eine positive Wachstumseigenschaft aufweisen. Dabei stellte sich heraus, dass sich das Endothel-, zwei Epithelzellmedien, Epilife- und Parathyreozyten-Medium nicht zur Kultivierung der Klone eignen, da keine Vorteile in der Proliferationsgeschwindigkeit auftraten (Abbildung 9, Medien 2-6). Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen zunächst das komplexe Stammzell-Medium Intesticult (Abbildung 9, Medium 1) verwendet, um einer möglichen Dedifferenzierung der Zellen entgegenzusteuern.

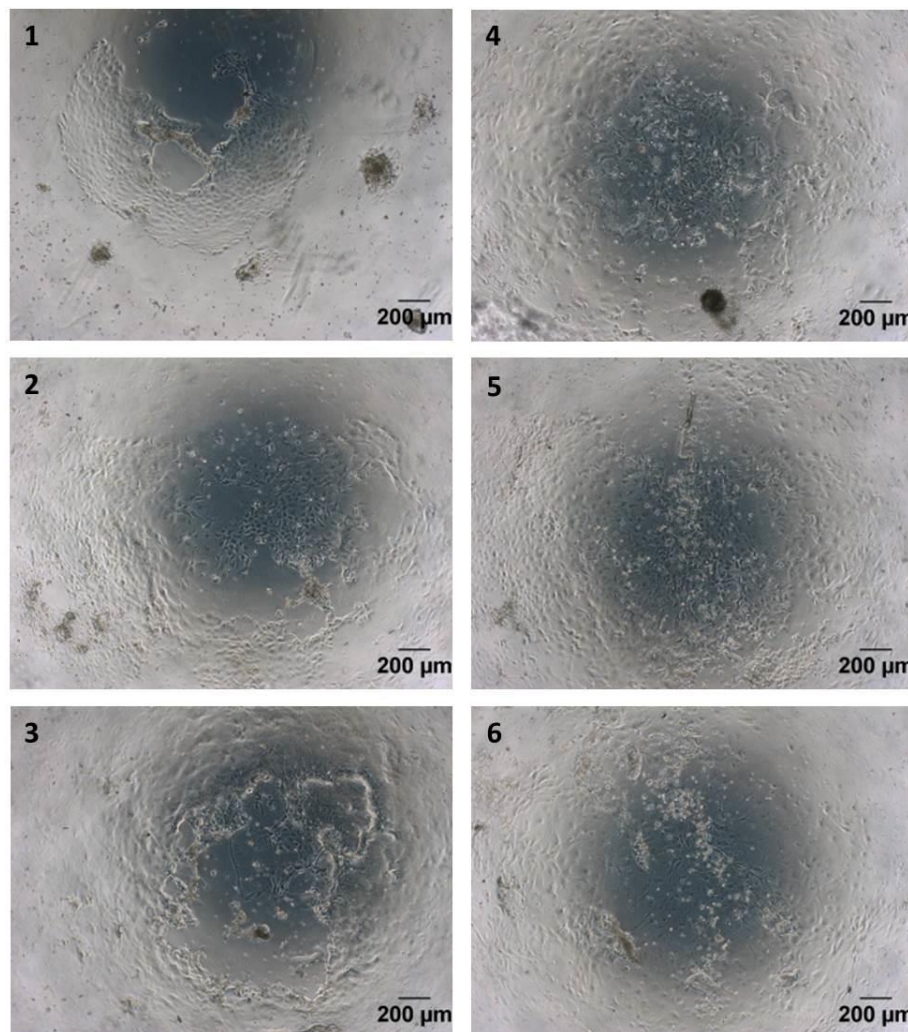


Abbildung 9: Optimierung der Zellkulturmedien.

Um das optimale Kultivierungsmedium für eine 2D-Kultivierung zu ermitteln, wurden 6 verschiedene Medien (1-Intesticult-Stammzellmedium, 2-Airwayepithelzellmedium, 3-Medium für murine intestinale Zellen, 4- Endothelzellmedium. 5-Epilife (Medium optimiert für Epithelzellen) und 6-Medium für Parathyreozyten) verwendet. Die murinen intestinalen Kryptenkulturen wurden aus dem Matrigel herausgelöst und in 2D ausgesät. Dann erfolgte die Kultivierung für zwei Wochen in den verschiedenen Medien und die morphologische Untersuchung.

3.3 Transduktion von intestinalen Zellen in 2D-Kultivierung

Für eine erfolgreiche Immortalisierung mithilfe der CI-SCREEN-Genbank, war eine gute Infizierbarkeit der murinen intestinalen Organoidkultur die Grundvoraussetzung. Um diese Infizierbarkeit bzw. Transduktionseffizienz der Zellen zu untersuchen, wurde ein Reporter-Virus verwendet. Dafür wurden die murinen intestinalen Krypten aus dem Matrigel herausgelöst und in 2D-Kultivierung für zwei Wochen bis zur Konfluenz inkubiert. Zur Analyse der Transduktionseffizienz wurden die Zellen parallel (in einem separaten Ansatz) zu den Lentiviren mit den Immortalisierungsgenen auch mit Lentiviren, die eine GFP-Expression vermitteln, transduziert.

Um eine möglichst hohe Effizienz bzw. Virusdichte bei den Transduktionen zu erzielen, wurde der Virus aufkonzentriert (Abbildung 10). Zunächst wurde mit *Chinese Hamster Ovary*-Zellen (CHO-Zellen) gearbeitet, um die Effektivität der Aufkonzentration zu bestimmen. Außerdem wurde die Transduktionseffizienz von nicht- aufkonzentriertem Virus mit aufkonzentriertem Virus verglichen, um für die Transduktion der murinen intestinalen Krypten die optimale bzw. nötige Virusmenge herauszufinden. Um die Promotor-Abhängigkeit zur Transduktionseffizienz zu analysieren, wurden sowohl der SV40-Promotor als auch der SFFV-Promotor untersucht.

Es wurde deutlich, dass mithilfe des aufkonzentrierten GFP-Virus sowohl bei dem SV 40 als auch SFFV-Promotor bei einer 1/10-Verdünnung des Virus eine vollständige Infektion von CHO-Zellen erreicht wurde. Das heißt es wurden 100 % positive Zellen mit einem GFP-Signal gemessen, sodass der aufkonzentrierte Virus eine hohe Transduktionseffizienz ermöglichte (Abbildung 10 A). Für die Transduktion von 100 % der Zellen musste der unaufkonzentrierte Virus in einer 1/1-Verdünnung eingesetzt werden. Eine höhere Infektionsrate wurde jedoch mit dem SFFV-Virus erreicht. Aus der durchflusszytometrischen Analyse ging hervor, dass der Virus mit dem SFFV-Promotor die effektivste Transduktionseffizienz zeigte. Mit Zunahme des eingesetzten Virus wurde auch eine Steigerung der Infizierbarkeit der Zellen erzielt. Für die Ermittlung der Expressionshöhen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) im Diagramm aufgetragen (Abbildung 10 B). Daraus ging hervor, dass die aufkonzentrierten Viren eine deutlich höhere Expression bei einer 1/10-Virusverdünnung vermittelten als die nicht aufkonzentrierten SV40- und SFFV-Viren.

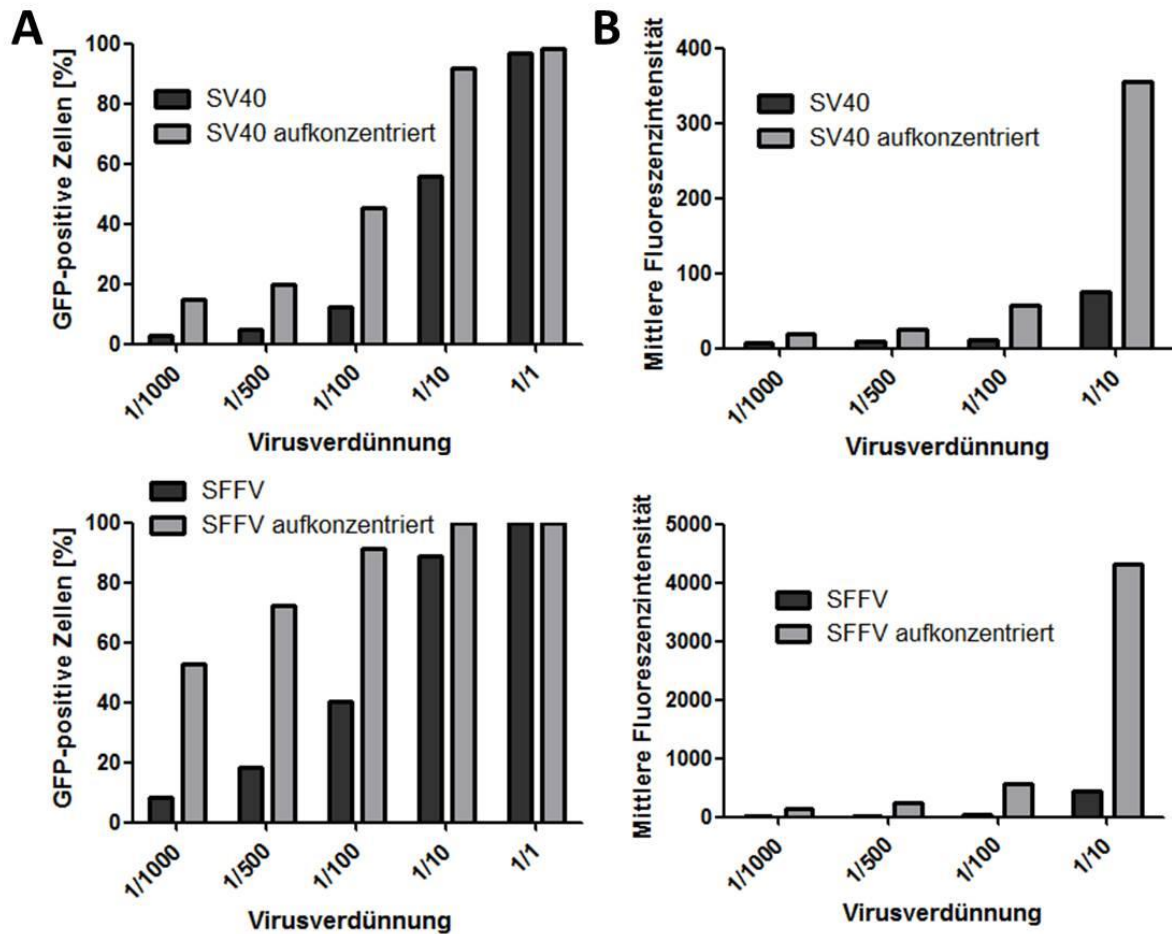


Abbildung 10: Analyse der Transduktionseffizienz.

Zur Analyse der Transduktionseffizienz wurde die Kontrollzelllinie CHO mit einem Reportervirus transduziert. Dieser Reportervirus vermittelte die Expression von GFP unter Verwendung der zwei unterschiedlichen Promotoren SV40 und SFFV. Dafür wurden die CHO-Zellen mit den GFP-Viren transduziert und nach drei Tagen durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Zum einen wurde die Transduktionseffizienz anhand der GFP-positiven Zellen ermittelt. Es wurden der SV40-Promotor und der SFFV-Promotor verwendet. **(B)** Zum anderen wurden die Expressionshöhen durch die Analyse der MFI von nicht-aufkonzentriertem SV40- bzw. SFFV-Virus verglichen.

Wie bereits beschrieben, wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Immortalisierung durchgeführt. Einerseits wurden die Zellen zunächst in 2D-Umgebung ausgesät und mit lentiviralen Partikeln transduziert (I9). Hierbei wurde ein Teil der CI-SCREEN Genbank (Id1, Id2, Id3, Myc, Fos, E7, Rex, Nanog, Core, Tag), wobei die Viren diese Gene kodieren, verwendet. Dabei kam es zu einer zufälligen Integration der Gene ins Genom, sodass verschiedene Kombinationen aus den 10 transduzierten Genen zu einem klonalen Wachstum der Zellen führten. Zum anderen wurden die Zellen mit einem GFP-Reportervirus behandelt, um die Effizienz der Transduktion in den Kryptenzellen zu visualisieren bzw. zu messen. Mittels durchflusszytometrischer Messung der SV40-GFP-infizierten Zellen wurden 15 % der

3. Ergebnisse

Zellen als GFP positiv analysiert, wobei mit dem SFFV-Promotor 30 % der Zellen GFP positiv messbar waren. Diese Beobachtung korreliert auch mit den Fluoreszenzaufnahmen. Die lentiviralen Vektoren, die GFP mittels des SV40-Promotors exprimieren, transduzierte einen geringeren Teil der Zellen als die Viren, in denen GFP durch den SFFV-Promotor exprimiert wird. Somit wurde gezeigt, dass die intestinalen Zellen sowohl mit einem SV40- als auch SFFV-Promotor infizierbar waren (Abbildung 11).

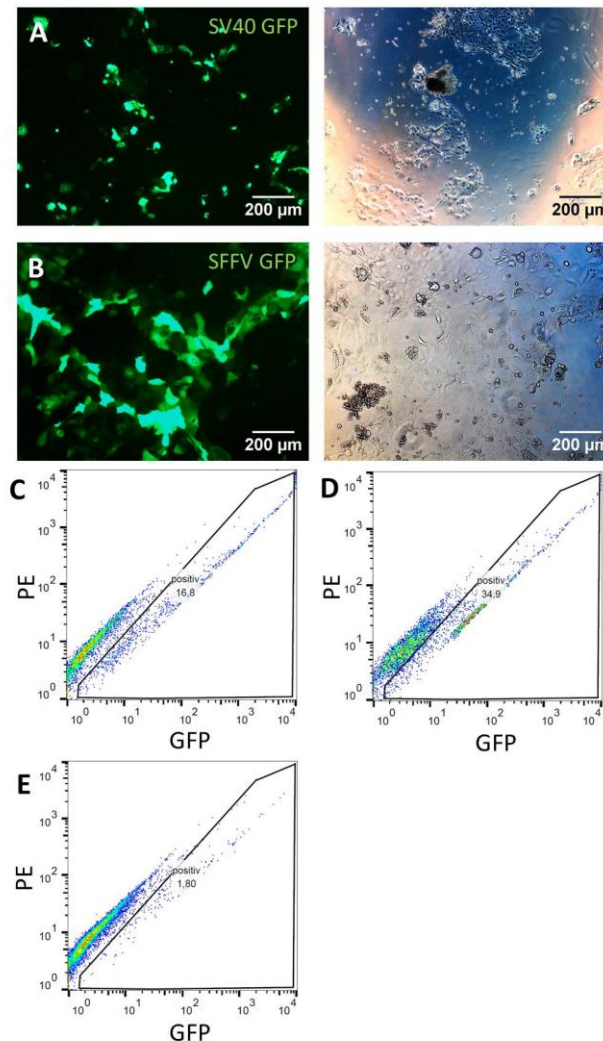


Abbildung 11: Analyse der Transduktionseffizienz der zweidimensional kultivierten Darmepithelzellen.

Die Zellen wurden aus dem Matrigel aus ihrer 3D-Umgebung herausgelöst und auf Fibronectin/KollagenR-beschichtete Wells für eine Woche in 2D kultiviert. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie neben den immortalisierenden Lentiviren mittels SV40-GFP und SFFV-GFP lentiviral transduziert. Dabei handelt es sich um lentivirale Vektoren, die einen SV40 - oder SFFV-Promotor besitzen und als Reportergen GFP exprimieren. **(A, B)** Immunfluoreszenzaufnahmen und Durchlichtbilder zur Darstellung der GFP-positiven Zellen in 2D-Kultivierung nach lentiviraler Transduktion mit einem **(A)** SV40-Virus oder **(B)** SFFV-Virus. **(C, D)** Durchflusszytometrische Analyse der mit **(C)** SV40-GFP-Virus oder **(D)** SFFV-GFP-Virus-transduzierten zweidimensional kultivierten Organoidkulturen. **(E)** Durchflusszytometrische Analyse der uninfizierten murinen intestinalen Organoidkulturen aus der 2D-Kultur als Kontrolle.

3. Ergebnisse

Nach der Transduktion der Zellen mit der CI-SCREEN Genbank, wurde ein Teil der Zellen erneut in Matrigel ausgesät, während der andere Teil weiterhin zweidimensional kultiviert wurde.

Nachdem die Klone wieder in die ursprüngliche Umgebung im Matrigel ausgesät waren, entwickelten sich nach einiger Zeit Kolonien, die aus dem Matrigel herauswuchsen. Nach 40-50 Tagen konnten diese Kolonien gepickt und in ein neues Kultivierungsgefäß zur Expansion umgesetzt werden (Abbildung 12). Auch während der 2D-Kultivierung wurde gezeigt, dass morphologisch unterschiedliche Klone heranwuchsen und auf ein neues Kultivierungsgefäß umgesetzt wurden. Nachdem die Krypten erneut passagiert und wieder in Matrigel ausgesät wurden, bildeten die Zellen weiterhin Krypten-artige Strukturen aus und wurden Primär-ähnlich kultiviert. Die Zellen wurden somit durch die Transduktion nicht stark in ihrem Phänotyp bzw. in ihrem Wachstum verändert.

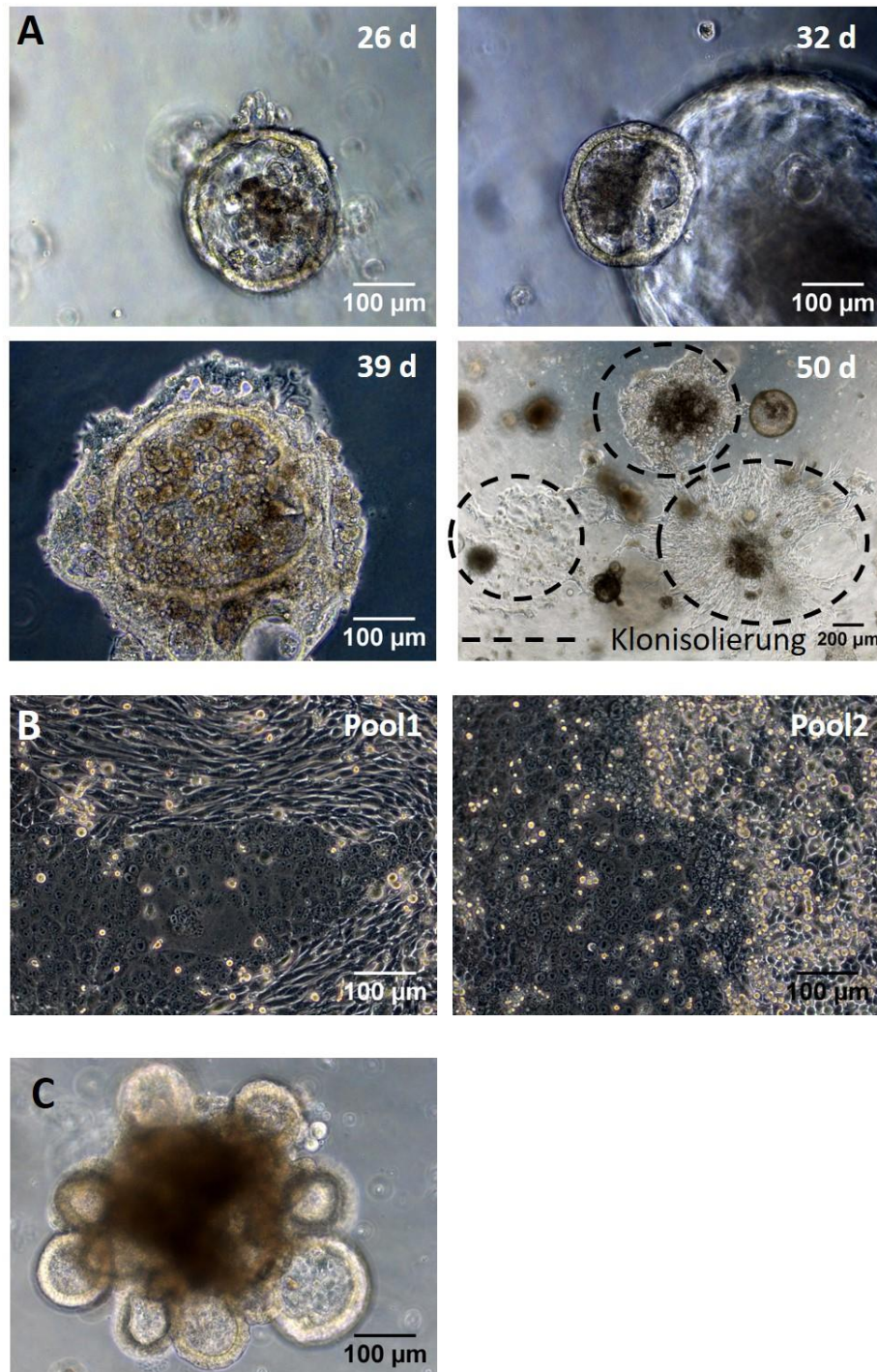


Abbildung 12: Entstehung der Klone aus Infektion I9.

Die murinen intestinalen Organoidkulturen wurden mit aufkonzentrierten Lentiviren der CI-SCREEN-Bank transduziert und danach zum einen zweidimensional weiter kultiviert und zum anderen dreidimensional in Matrigel ausgesät. Nach einigen Wochen entstanden Kolonien, die aus dem Matrigel herauswuchsen und vermehrt wurden. Auch die weiterhin in 2D-Kultur gehaltenen Zellen wurden expandiert. Nach erneutem Umsetzen der dreidimensional kultivierten Krypten veränderten diese ihren Phänotypen nicht und wurden als Organoid-Strukturen kultiviert. **(A)** Nach der Infektion mit den immortalisierenden LentiX-aufkonzentrierten Viren wurde ein Teil der Zellen wieder in Matrigel ausgesät. Daraus wurden nach ca. 7 Wochen Klone isoliert und expandiert. **(B)** Der andere Teil wurde weiterhin in 2D-Umgebung kultiviert, wobei auch unterschiedliche Morphologien sichtbar wurden. **(C)** Auch nachdem die Zellen vereinzelt und erneut in Matrigel ausgesät wurden, entstanden eine Woche später wieder Krypten-Strukturen, die vermehrt wurden.

3. Ergebnisse

Bei der zweiten Infektionsstrategie (I12) wurden die Zellen von Anfang an zweidimensional kultiviert und auch nach der lentiviralen Transduktion ausschließlich in 2D-Kultur gehalten. Dafür wurden die murinen intestinalen Organoidkulturen aus dem Matrigel herausgelöst und für eine Woche auf Fibronektin/KollagenR-beschichteten Kultivierungsplatten inkubiert. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden diese lentiviral transduziert. Zur Analyse der Transduktionseffizienz wurden auch bei dieser Transduktion die Zellen zur Kontrolle mit GFP-Viren infiziert (in einem separaten Ansatz) parallel zu den immortalisierenden Lentiviren. Vergleichbar zur Infektion I9 wurden auch bei dieser Infektion 30 % der Zellen mit dem SFFV-GFP Lentivirus transduziert und 15 % mit dem SV40-GFP-Virus. Dies stimmte mit den aufgenommenen Fluoreszenzbildern überein.

Zusammenfassend wurden 42 neue Zelllinien generiert, die zur genaueren Analyse weiter charakterisiert wurden. Insgesamt waren aus der Infektionsstrategie I9 mit kombinierter 2D- und 3D-Kultivierung 26 Linien hervorgegangen und aus der Infektionsmethode I12 mit 2D-Kultivierung 16 Zelllinien entstanden (Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht der erzeugten Zelllinien aus den zwei Immortalisierungsansätzen

Infektion I9							
Pool1	Pool2	K2	K4	K5	K6	K7	K8
Infektion I9							
K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16
Infektion I9							
K17	K18	K19	K20	K21	K23	K24	K25
Infektion I9							
K26	K27						
Infektion 12							
K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Infektion I12							
K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16

3.4 Generierung funktionaler intestinaler Darmzellen aus der Maus

Zunächst wurden die verschiedenen Zelllinien morphologisch analysiert. Hierbei waren eindeutige Unterschiede zwischen den Klonen zu erkennen, während die Zellen des Klons I9K5 oder I9K18 eher runde Zellen mit wenig Zell-Zell-Kontakten aufwiesen, schienen die Zellen der anderen Klone starke Interaktionen miteinander einzugehen und einen konfluenten Zellrasen auszubilden (Abbildung 13).

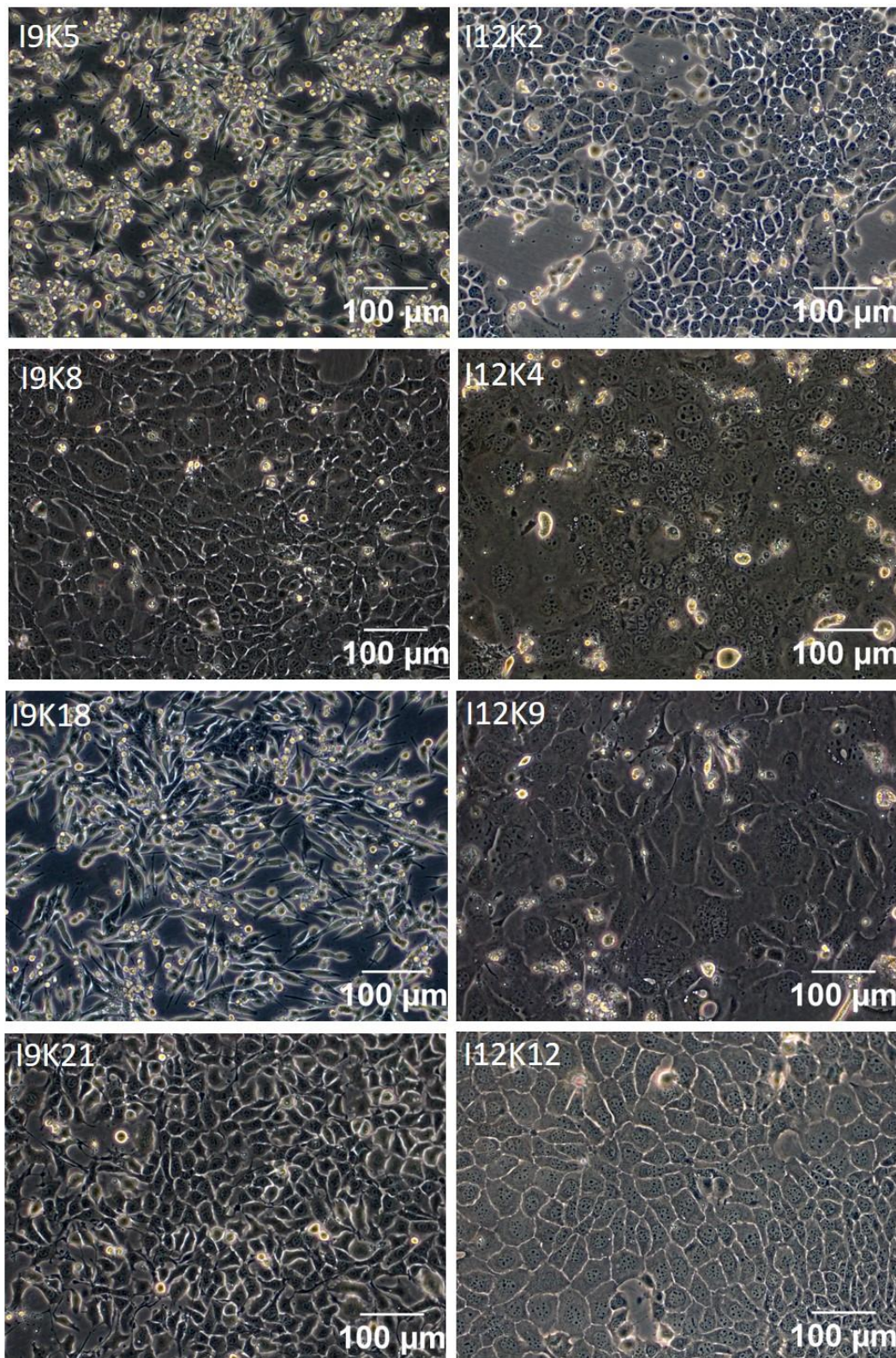


Abbildung 13: Morphologien der verschiedenen Klone.

Exemplarisch sind jeweils vier immortalisierte Klone aus der Infektion I9 und vier Klone der Infektion I12 morphologisch dargestellt. I9K5 der Passage 17 und I9K18 der Passage 13 zeigten keine Zell-Zell-Kontakte, wohingegen I9K8 und I9K21 der Passage 16 einen dichten Zellrasen ausbildeten. Die Klone I12K2 und I12K12 der Passage 8 und I12K4 und I12K9 der Passage 5 aus der Infektion I12 zeigten deutliche Zell-Zell-Kontakte.

3. Ergebnisse

Um zu zeigen, dass die Zellen wirklich immortalisiert sind, wurden die Klone 200-300 Tage in Kultur gehalten. In Abbildung 14 ist dies exemplarisch für 6 entstandene Klone dargestellt. Auch nach erneutem Auftau- und Einfrierprozess (Abbildung 14, roter Punkt) zeigten die Zelllinien robustes Proliferationsverhalten und keinen Einbruch in der kumulativen Populationsverdopplung.

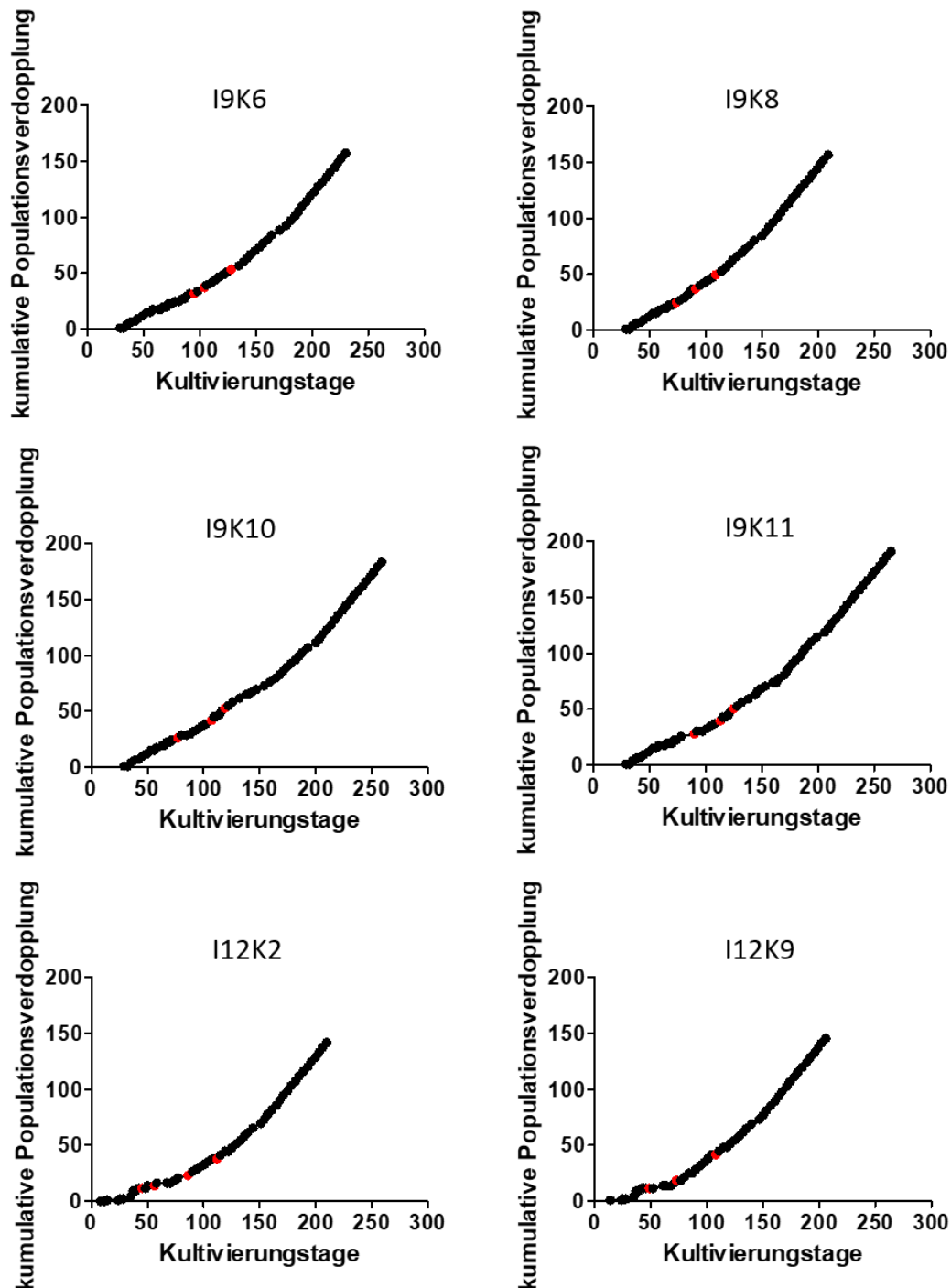


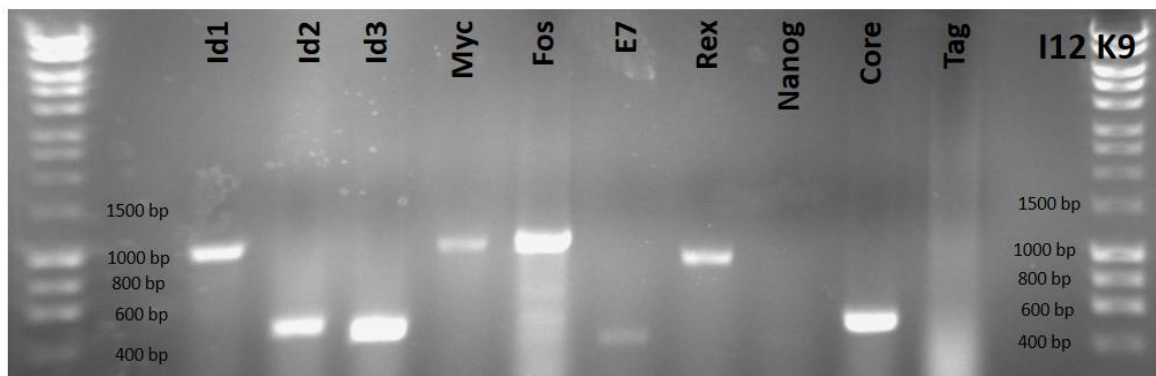
Abbildung 14: Wachstumskurven exemplarisch ausgewählter Klone.

Die verschiedenen immortalisierten Klone wurden für ca. 250 Tage kultiviert und zeigten ähnliche kumulative Populationsverdopplungen. Nach erneutem Auf- und Einfrierprozess waren die Zellen weiterhin gut kultivierbar (●).

3. Ergebnisse

Für die Immortalisierung der murinen intestinalen Kryptenkulturen mittels CI-SCREEN-Technologie wurde eine Genbank aus verschiedenen Immortalisierungsgenen in die Zellen lentiviral transduziert. Dabei kam es zur zufälligen Integration einzelner Gene in das Genom, sodass die Zellen unsterblich wurden und unbegrenzt kultivierbar waren. Im nächsten Schritt wurde analysiert welche der eingebrachten Immortalisierungsgene in die einzelnen Klone integriert wurden. Dafür wurde die DNA der Klone isoliert und auf die Integration der transduzierten Gene der CI-SCREEN-Genbank mittels PCR analysiert. Exemplarisch für die Integration der Immortalisierungsgene wird jeweils ein Klon aus der Infektion I9 und ein Klon aus der Infektion I12 dargestellt (Abbildung 15).

A Infektion I12



B Infektion I9

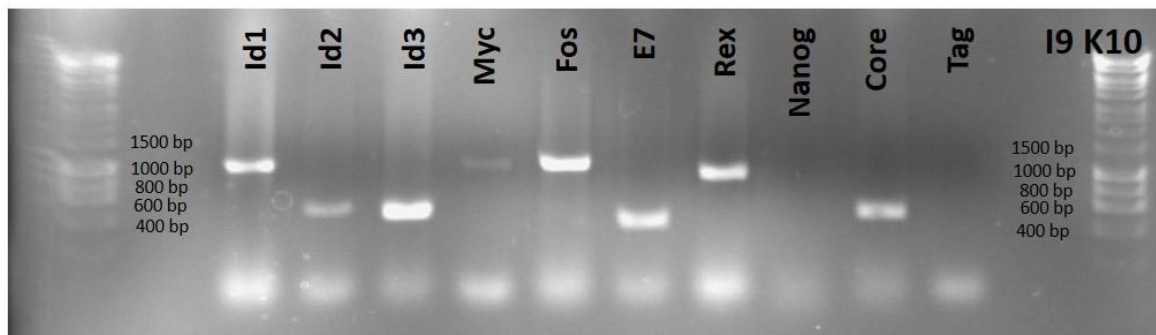


Abbildung 15: Analyse der integrierten Immortalisierungsgene.

Für die Analyse der transduzierten Immortalisierungsgene aus der CI-SCREEN-Genbank wurde die DNA aus zweidimensional kultivierten Zellen isoliert und mittels PCR und spezifischer Primer untersucht. **Bandengrößen:** Id1 980 bp, Id2 462 bp, Id3 453 bp, Myc 1001 bp, Fos 1054 bp, E7 404 bp, Rex 920 bp, Nanog 935 bp, Core 487 bp, Tag 1214 bp.

Es wurden insgesamt 16 Klone aus den zweidimensional transduzierten Zellen (I12) analysiert und insgesamt 10 Klone aus der Immortalisierungsstrategie mittels 2D- und 3D-Kultivierung (I9). Für die Transduktion wurden 10 Immortalisierungsgene aus der CI-SCREEN-Genbank ausgewählt und lentiviral in die Zellen eingebracht.

3. Ergebnisse

Für die Strategie zur Immortalisierung in 2D- und 3D-Kultivierung (I9) wurden hauptsächlich die Immortalisierungsgene Id2, Id3, Myc, E7, Rex und Core nachgewiesen. Tag war in keiner generierten Zelllinie integriert. Die Klone variierten größtenteils in der Expression von Nanog (Tabelle 25).

Tabelle 25: Gene der CI-SCREEN-Genbank zur Immortalisierung der Zellen aus kombinierter 2D- und 3D-Immortalisierungsstrategie (I9)

	Id1	Id2	Id3	Myc	Fos	E7	Rex	Nanog	Core	Tag
K4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K5	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K6	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	X
K8	X	✓	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X
K10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K11	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	X
K17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K21	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K23	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	X
prozentuale Integration	70%	100%	100%	90%	70%	90%	100%	40%	100%	0%

Bei der ausschließlich zweidimensionalen Immortalisierungsstrategie (I12) wurden von den 10 verwendeten Genen durchschnittlich 8 Gene nachgewiesen. Bei den 16 analysierten Klonen wurden überwiegend die Gene Id2, Id3, Myc, Fos, E7, Rex, Nanog und Core ermittelt. Auch hier zeigten die Klone keine Integration von Tag und unterschieden sich hauptsächlich im Nachweis von Id1 (Tabelle 26).

Tabelle 26: Gene der CI-SCREEN- Genbank zur Immortalisierung der 2D-Strategie (I12)

	Id1	Id2	Id3	Myc	Fos	E7	Rex	Nanog	Core	Tag
K1	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K2	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	X
K3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K5	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X
K7	X	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	X
K8	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K10	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	X	X
K11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K12	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
K15	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X
K16	X	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	X
prozentuale Integration	43,75%	93,75%	93,75%	87,50%	81,25%	100%	100%	81,25%	87,50%	0%

Bei Infektion I9 waren es durchschnittlich 8 integrierte Immortalisierungsgene, wohingegen Id1 im Vergleich zur I12-Infektion häufiger als Nanog nachgewiesen wurde. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die deutlichsten Unterschiede in der Integration der Gene Id1 und Nanog ergaben. Bei der

3. Ergebnisse

kombinierten Immortalisierungsstrategie aus 2D- und 3D-Kultivierung (I9) wurde Id1 häufiger nachgewiesen im Vergleich zur 2D-Strategie (I12), wobei dort Nanog häufiger ins Genom integrierte. Bei beiden Immortalisierungsansätzen waren häufig Id2, Id3, Myc, Fos, E7, Rex und Core integriert (Tabelle 27).

Tabelle 27: Zusammenfassung der prozentualen Genintegration beider Immortalisierungsansätze

	Id1	Id2	Id3	Myc	Fos	E7	Rex	Nanog	Core	Tag
prozentuale Integration	53,85%	96,15%	96,15%	88,46%	76,92%	96,15%	100,00%	65,39%	92,30%	0,00%

Für die weitere Analyse der generierten murinen intestinalen Epithelzellen sollte ein Marker verwendet werden, der möglichst charakteristisch für Darmepithelzellen ist. Dafür wurde Epcam gewählt, welches das epitheliale Zelladhäsionsmolekül darstellt. Dieses Oberflächenmolekül vermittelt Zell-Zell-Kontakte, was typisch für Darmzellen ist. Diese bilden im Dünndarm eine dichte Barriere aus und stellen somit starke Zellkontakte zur Verfügung. Somit sollte zunächst eine grobe Zuordnung der Klone mittels durchflusszytometrischer Analyse erfolgen. Ein Großteil der Zellen wurde auf die Epcam-Expression analysiert. Dabei zeigten sich Klone, die keine **(A)**, eine mittlere **(B)** oder eine sehr starke Expression **(C)** des epithelialen Adhäsionsmoleküls aufwiesen (Abbildung 16). Besonders bei den analysierten Klonen aus der kombinierten Immortalisierungsstrategie von 2D- und 3D-Kultivierung (I9) zeigten sich große Unterschiede in der Expressionshöhe von Epcam. Im Vergleich dazu wurden in der 2D-Strategie zur Immortalisierung (I12) nur Klone analysiert bzw. generiert, die Epcam auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 16). Weiterhin wurden Klone wie z.B. I12K14 generiert, die eine sehr heterogene Expression des Epcam-Proteins zeigten. Dabei kann wahrscheinlich von keinem reinen Zellklon ausgegangen werden.

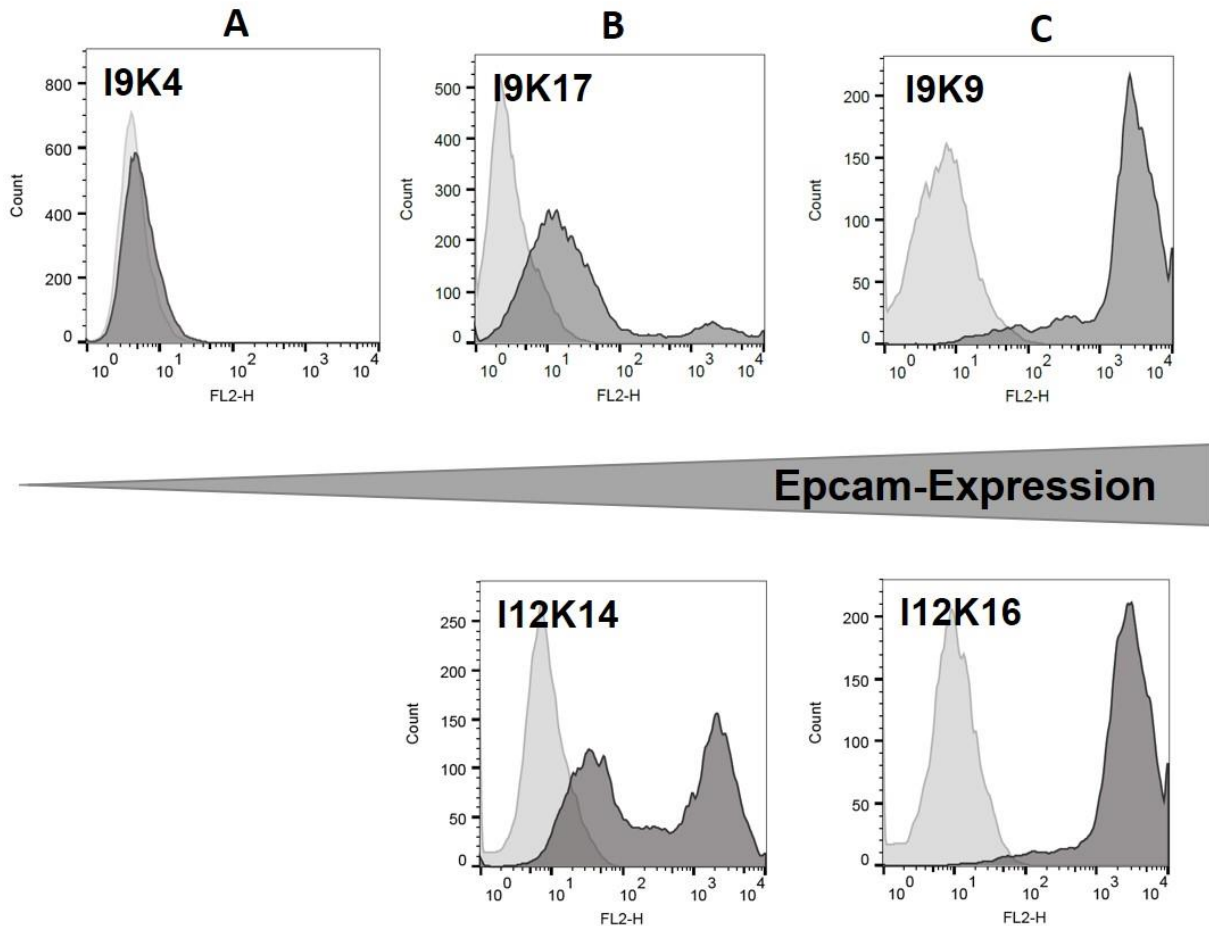


Abbildung 16: Einteilung der generierten Klone nach unterschiedlicher Epcam-Expression.

Die immortalisierten Zellen wurden zweidimensional kultiviert und mittels Durchflusszytometrie auf das epitheliale Zelladhäsionsmolekül untersucht. Dafür wurden die Zellen abgelöst und für 1 h mit dem spezifischen Primärantikörper, der direkt mit PE markiert war, inkubiert. Die Analyse der Expression wurde mit dem Durchflusszytometer durchgeführt und über FlowJo analysiert. Exemplarisch wurden einige Klone der Passage 12 aus der Infektion I9 und der Infektion I12 der Passage 6 dargestellt. In hellgrau sind die ungefärbten Zellen dargestellt und in dunkelgrau, die mit Epcam angefärbten Zellen. **(A)** Als Beispiel für keine Epcam-Expression wurde der Klon K4 aus der Infektion I9 gezeigt. **(B)** Als exemplarische Klone für eine mittlere Expression des Zelladhäsionsmoleküls Epcam wurde der Klon K17 aus der Infektion I9 und K14 aus der Infektion I12 gezeigt. **(C)** Eine sehr hohe Expression von Epcam wurde beispielsweise bei K9 der Infektion I9 und K16 der Infektion I12 ermittelt.

Aus der Analyse der MFI wurde ersichtlich, dass aus dem Ansatz mit kombinierter 2D- und 3D-Kultivierung (I9) ein breites Spektrum an Klonen mit verschiedenen Epcam-Expressionen erhalten wurde. Es waren Klone entstanden, die keine Epcam-Expression aufwiesen und auch Klone mit einer sehr hohen Expression des Zelladhäsionsmoleküls. Bei den Klonen aus der Immortalisierungsstrategie mit kombinierter 2D- und 3D-Kultivierung (I9) zeigen einige Klone (8) keine bzw. nur eine sehr geringe Expression des Zelladhäsionsmoleküls Epcam. Wohingegen von den 5 untersuchten Klone aus dem Immortalisierungsansatz mit ausschließlich zweidimensional kultivierten Zellen (I12) alle eine erhöhte Expression von Epcam

3. Ergebnisse

aufwiesen. In Tabelle 28 ist eine Zusammenfassung der erzielten Resultate dargestellt.

Bei dem Immortalisierungsansatz mit kombinierter 2D- und 3D-Kultivierung (I9) hatten ca. 70 % der analysierten Klone eine MFI von unter 1000, wobei aus Immortalisierungsstrategie mit nur 2D-Kultivierung (I12) keiner der analysierten Zellklone eine niedrige MFI besaß. Alle Klone aus der Infektion I12 zeigten eine MFI von über 1000. 20 % der untersuchten Klone wiesen eine heterogene Expression von Epcam auf. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass es sich nicht um klonale Zelllinien handelt, sondern eher ein Gemisch aus verschiedenen Zellen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Einteilung der Klone aus der Infektion I9 und I12 in niedrige (<1000 MFI) und hohe (>1000 MFI) Expression von Epcam sowie heterogene oder homogene Epcam-Expression

	< 1000 MFI	> 1000 MFI	heterogene Expression
I9K2	44,5		
I9K4	7,89		
I9K5	16,4		
I9K6		1926	
I9K7	107		
I9K9		2468	
I9K11	673		
I9K12	838		
I9K13	175		
I9K14		1343	
I9K15	4,94		
I9K16	174		
I9K17	227		
I9K18	549		
I9K19	34,9		
I9K20		1420	
I9K24	918		
I9K25	249		
I9K26		4306	
I9K27		3042	
I12K7		1602	
I12K13		1931	
I12K14		1178	
I12K15		1943	
I12K16		3143	
I9	70%	30%	20%
I12	0%	100%	20%
Gesamt	56%	44%	20%

Zur weiteren Charakterisierung der generierten Zelllinien wurde zunächst RNA isoliert und Zelltyp-spezifische Marker der einzelnen Darmzellen analysiert. Dafür wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und diese mittels spezifischer Primerpaare mittels einer quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) untersucht. Exemplarisch wurden einige Klone der Infektion I12 (I12K2, I12K7, I12K9, I12K10, I12K13) auf die Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls Epcam sowie Villin1 als Oberflächenprotein und die Verdauungsenzyme Sis und Mgam und Hes1 als

3. Ergebnisse

Transkriptionsfaktor typisch für absorptive Enterozyten analysiert. Außerdem wurde der Stammzellmarker Lgr5, sowie Marker für die sekretorischen Zelltypen (Becherzellen, Panethzellen) Atoh1 untersucht. Weiterhin typisch für die sekretorischen Zelltypen sind Muc2 für Becherzellen und Lysozym1 und Defensin als antimikrobielle Peptide für Panethzellen. Aus der Analyse ging hervor, dass die Klone eine sehr ähnliche Expressionshöhe bestimmter Gene zeigten. Es wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül Epcam und Hes-1 als Differenzierungsmarker in Richtung absorptive Enterozyten mit höherer Expression nachgewiesen. Auch der Stammzellmarker Lgr5 konnte in sehr geringen Mengen ermittelt werden. Für die Enterozyten-spezifischen Gene Villin1, Sis und Mgam wurde eine geringere Expressionshöhe ermittelt (Abbildung 17).

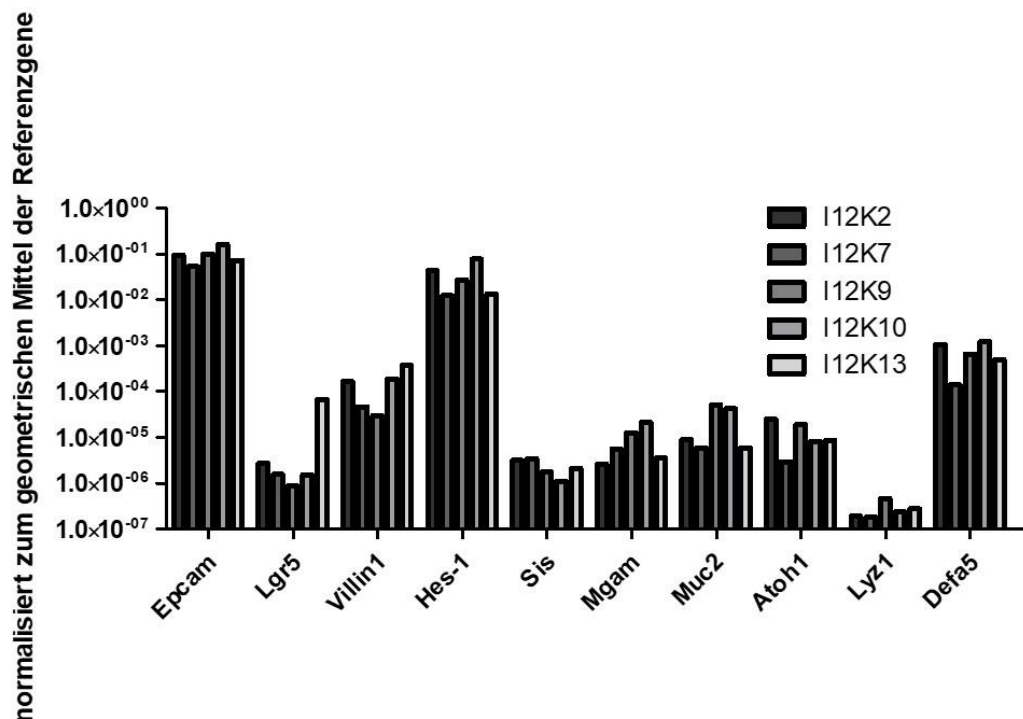


Abbildung 17: Übersicht der analysierten Zelltyp-spezifischen Marker von generierten Klonen der Infektion I12.

Die Klone aus der Infektion I12 wiesen ähnliche Expressionshöhen auf. Die Zellen wurden für einige Wochen in Stammzellmedium kultiviert und ein konfluentes 6 Well geerntet. Es wurden einzelne Gene untersucht, die typisch für die verschiedenen Zellen sind. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül Epcam sowie Hes-1, welches die Differenzierungsrichtung in die absorptiven Enterozyten aufzeigt. Andere Enterozyten Marker wie die Enzyme Sis und Mgam wurden untersucht sowie das Protein Villin1 zur Oberflächenvergrößerung durch Mikrovilli. Weiterhin wurde der Stammzellmarker Lgr5 gezeigt. Typisch für sekretorische Zellen ist die Expression von Atoh1, wobei Mucin2 für die Becherzellen und Lysozym1 und Defensin5 für die Panethzellen betrachtet wurden.

Außerdem wurden einige der generierten Klone auf die Stammzell-ähnlichen Eigenschaften untersucht. Diese Analyse sollte gewährleisten, dass Zelllinien

3. Ergebnisse

identifiziert werden, die weiterhin in alle anderen Zelltypen des Dünndarms in der Kultur differenzieren können. Hierfür wurde eine qRT-PCR durchgeführt, welche die Expression von *Lgr5* ermittelt.

Die Analyse erfolgte im Vergleich zum *Housekeeping*-Gen *Rpl15*. Als Kontrollen wurden die murinen IECs und murine intestinale Kryptenkulturen verwendet. Es wurde deutlich, dass alle generierten Zelllinien eine ähnliche Expression von *Lgr5* zeigten und sich auch nicht deutlich von den murinen intestinalen Krypten unterschieden (Abbildung 18, primäre Kryptenkultur). Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass es sich um Zellen mit erhaltenem Differenzierungspotential des Dünndarms handelte.

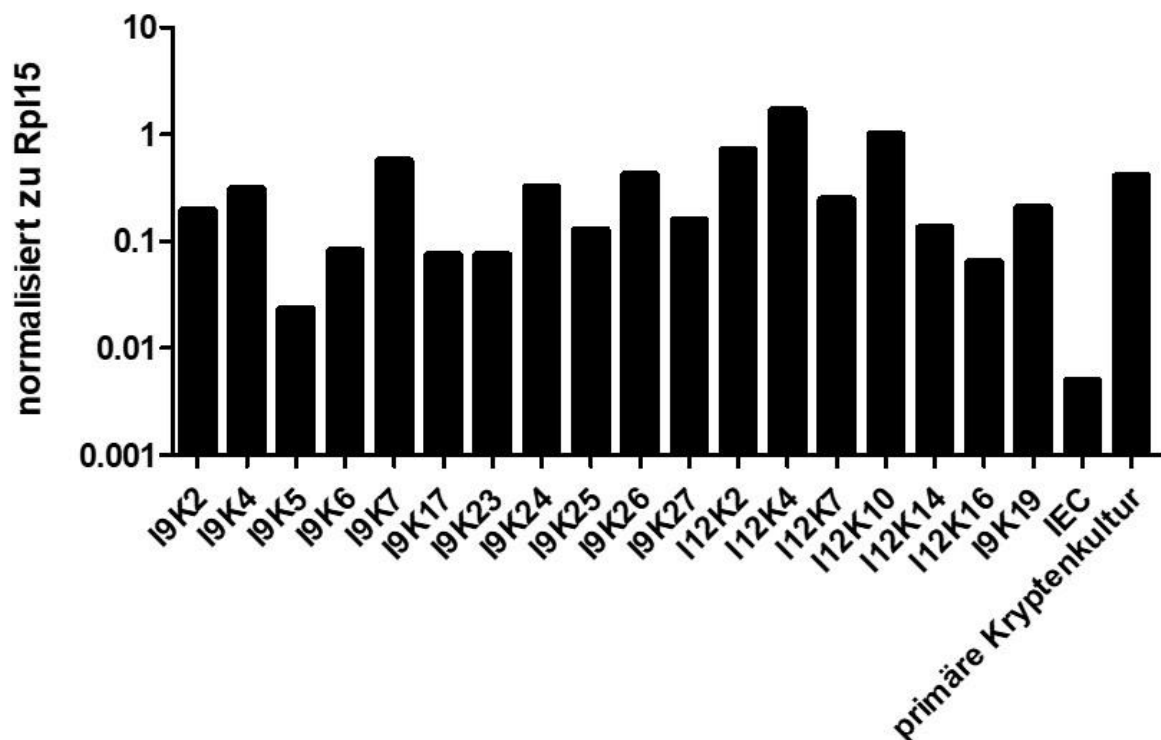


Abbildung 18: Analyse des Stammzellmarkers *Lgr5*.

Die generierten Zelllinien wurden zweidimensional für mehrere Wochen im Stammzell-Medium kultiviert. Daraus wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR der Stammzellmarker *Lgr5* untersucht. Als Kontrollen wurde die IEC-Zelllinie analysiert. Als Positivkontrolle wurde die *Lgr5*-Expression der murinen intestinalen Kryptenzellen als Vergleich herangezogen.

3.4.1 Enterozyten

Den Hauptteil des Dünndarmepithels bilden die Enterozyten. Sie dienen größtenteils zur Resorption von Nahrungsbestandteilen und kleiden das Epithel vollständig aus.

Charakteristisch für Enterozyten aus dem Dünndarm ist die Ausbildung einer Barriere, um Pathogene und andere Fremdstoffe abzuschirmen und das Eindringen von Krankheitserregern zu verhindern.

Diese Epithelzellen werden durch eine hohe Expression von Zelladhäsionsmolekülen und starke Zell-Zell-Kontakte wie beispielsweise Ecadherin und ZO-1 charakterisiert. Außerdem zeigen sie Mikrovilli (Villin1) auf ihrer apikalen Seite, sodass die Zelloberfläche zur besseren Nahrungsresorption vergrößert wird. Um dieses Protein Villin1 zur Oberflächenvergrößerung nachzuweisen, wurde die RNA der verschiedenen immortalisierten Zelllinien isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR auf die Villin-Expression untersucht (Abbildung 19). Dafür wurden die Zellen zweidimensional im Stammzell-Medium kultiviert. Als Vergleichszelllinie diente die zuvor generierte murine IEC-Zelllinie und die dreidimensional kultivierte Kryptenkultur. Die neu generierten Zelllinien wurden relativ zu den murinen intestinalen Kryptenkulturen betrachtet und es wurde deutlich, dass die exemplarisch ausgewählten Klone eine geringere Villin-Expression zeigten als die murinen intestinalen Organoidkulturen. Alle untersuchten Klone zeigten ähnliche Expressionshöhen des Oberflächenproteins Villin1 in 2D-Kultivierung. Die immortalisierten Zellen zeigten eine vergleichbare Villin-Expression zu den IEC. Abschließend kann festgehalten werden, dass die Klone zusammen mit den IEC zwei logarithmische Stufen weniger Villin exprimieren, sodass von nur einer sehr geringen Expression ausgegangen wurde.

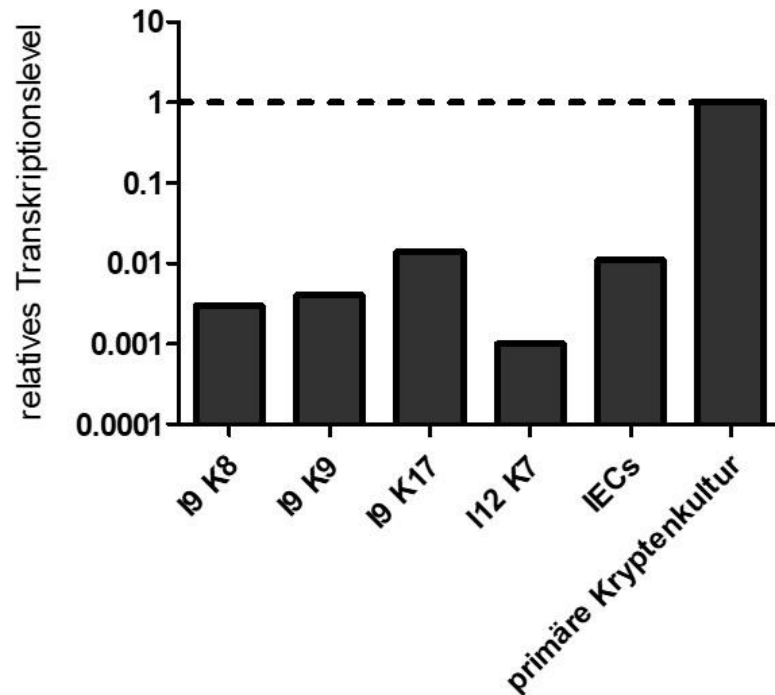


Abbildung 19: Expressionsanalyse des Enterozytenmarkers Villin.

Die generierten Klone wurden für mehrere Wochen in Stammzell-Medium kultiviert und im konfluenten Zustand die RNA geerntet. Nachdem die RNA isoliert wurde, wurde diese in cDNA umgeschrieben und für die qRT-PCR-Analyse verwendet. Zum Vergleich wurde die RNA aus den in Matrigel kultivierten murinen intestinalen Kryptenzellen verwendet.

Weiterhin ist für die Epithelzellen des Dünndarms charakteristisch, dass diese einen gerichteten Transport über spezifische Transporter vermitteln. Der Transporter Multidrug Resistenz Protein 1 (Mrp1/ABCC1) spielt eine Rolle bei Anti-Krebs-Medikamenten und ist ein mögliches Ziel für therapeutische Zwecke bei der Chemotherapie (He et al. 2011). Aus diesem Grund wurde der Transporter Mrp1 in einigen Klonen mittels PCR analysiert (Abbildung 20). Die Zellen wurden dafür für mehrere Wochen im Transwellsystem kultiviert und nach Ausbildung einer Barriere, wurde die RNA geerntet und auf die Expression des Transporters Mrp1 untersucht.

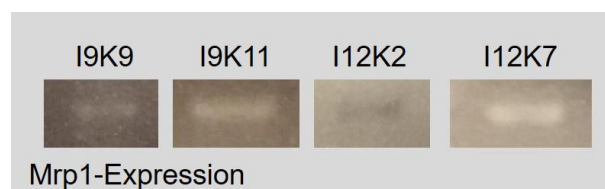


Abbildung 20: Expression des Transporters Mrp1 einiger Klone

Die Zellen (I9K9, I9K11, I12K2 und I12K7) wurden mit einer Zellzahl von 100.000 Zellen pro Well auf Transwells ausgesät und über mehrere Tage kultiviert. Nachdem die Barriere ausgebildet war, wurde die RNA geerntet und mittels PCR auf die Mrp1-Expression untersucht. **Produktgröße:** 858 bp

3. Ergebnisse

In Krankheiten wie cystischer Fibrose (CF) liegt eine fehlerhafte Regulation des Chlorid-Kanals vor. Um die Zellen als *in vitro* Modelle zur weiteren Untersuchung von Fehlregulationen in Krankheiten nutzen zu können, wurde die Expression des Chloridkanals Cystische Fibrose Transmembran Konduktanz Regulator (CFTR) auf den Dünndarmzellen mittels PCR analysiert (Abbildung 21). Die RNA der zweidimensional kultivierten Zellen wurde geerntet und über die Verwendung von zwei spezifischen Primerpaaren das Produkt für das CFTR-Gen amplifiziert. Daraus ging hervor, dass I9K8 und I9K17 eine leichte Expression des Gens zeigten, wobei die murinen intestinalen Primärkrypten ein deutlich stärkeres Signal aufwiesen. Dennoch war eine CFTR-Expression erkennbar, sodass die neu generierten Zellen für weitere Analysen zur Aufklärung von CF geeignet schienen.

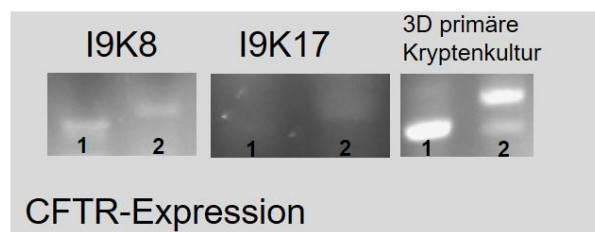


Abbildung 21: Expression des Chloridkanals CFTR

Die Zellen wurden aus der 2D-Kultivierung zur RNA-Analyse geerntet und auf die Expression des Membranproteins CFTR untersucht. Dafür wurden für die PCR zwei verschiedene Primerpaare (CFTR-1 und CFTR-2) verwendet, die das gleiche Produkt amplifizieren. Als Kontrolle wurden die dreidimensional kultivierten primären, intestinalen Kryptenzellen analysiert. **Produktgröße:** CFTR-1: 470 bp und CFTR-2: 715 bp.

Nach der Analyse des Oberflächenproteins Villin1 mittels qRT-PCR und des Transporters Mrp1 sowie des Chlorid-Kanals CFTR mithilfe von PCR, wurden spezifische *tight junction* Proteine wie ZO-1 und das Adhäsionsprotein Ecadherin analysiert, um die generierten Klone weiter zu charakterisieren.

Nachfolgend wurde die Expression von den Zelladhäsionsmolekülen ZO-1 und Ecadherin mittels Immunzytochemie auf den immortalisierten Zelllinien untersucht, um zu ermitteln, ob die Zellen Eigenschaften von Enterozyten aufwiesen. Diese Untersuchungen zeigten, dass der Klon I12K2 der Passage 8 ein einheitliches und starkes Signal sowohl von Ecadherin als auch ZO-1 zeigte. Im Gegensatz dazu wies der Klon I9K10 der Passage 34 keine Expression bzw. eine fehlerhaft lokalisierte Expression beider Proteine auf. Andere Klone wie z.B. I9K17 der Passage 10 hatten eine heterogene Expression von ZO-1. Dabei bildeten einige Zellen spezifische Abgrenzungen zueinander aus und andere Zellen exprimierten nur fehlerhaft lokalisiertes Protein. Als Vergleichszelllinie wurden ModeK Zellen untersucht, wobei

3. Ergebnisse

keine eindeutige Expression für das *tight junction* Protein ZO-1 ermittelt wurde (Abbildung 22). Um die Spezifität dieser Analysen zu untersuchen, wurde weiterhin nur der Sekundärantikörper zusammen mit den Zellen inkubiert und analysiert.

Zusammenfassend wurde demnach ein breites Spektrum an Klonen mit unterschiedlicher Proteinexpression bezüglich Ecadherin und ZO-1 generiert. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den generierten Zelllinien um Zellen mit Eigenschaften von Epithelzellen des Dünndarms (Enterozyten) handelt.

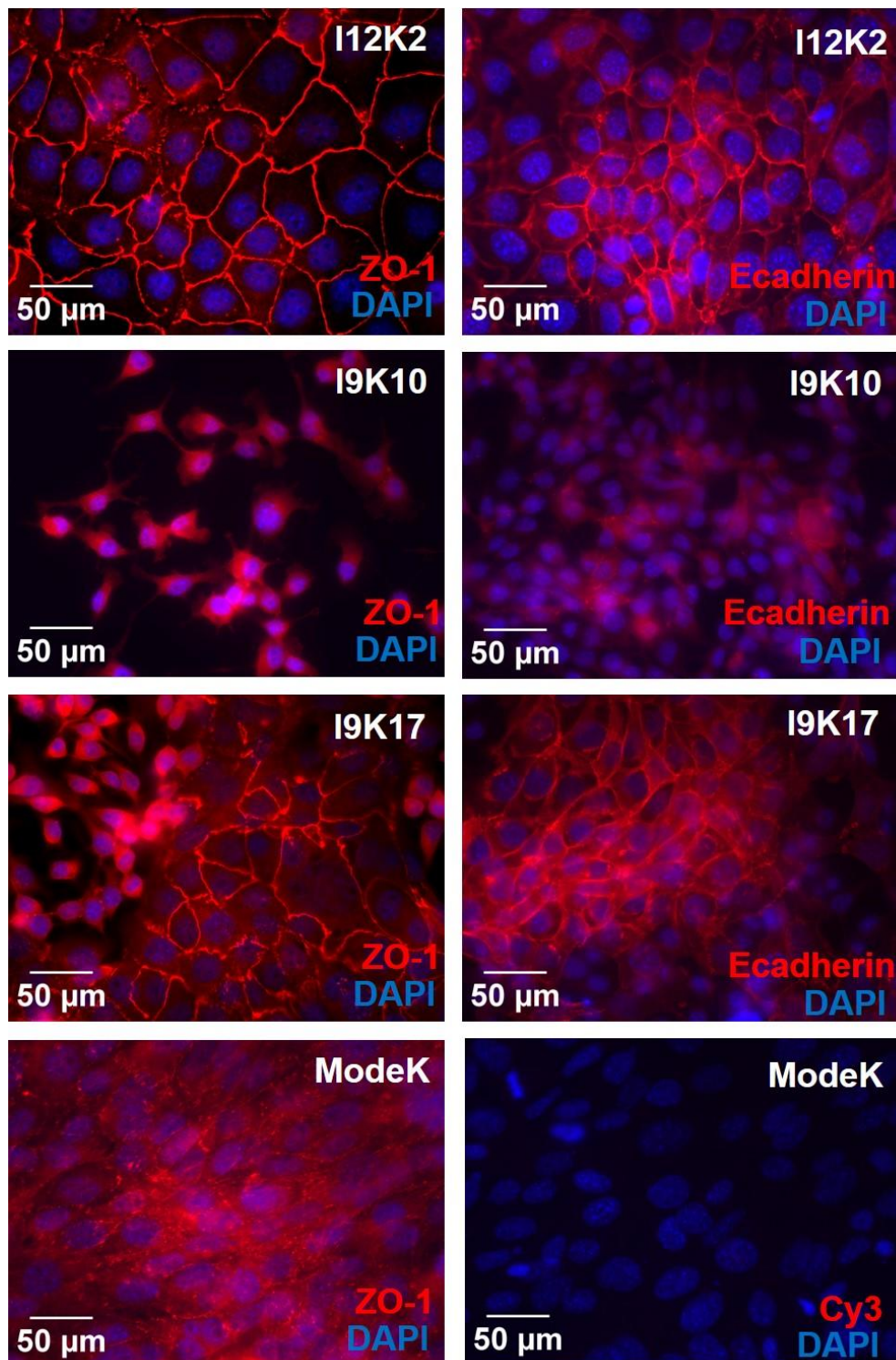


Abbildung 22: Immunzytochemie spezifischer Epithelzellmarker Ecadherin und ZO-1 in 2D-Kultivierung.

Die Zellen (I12K2, I9K17, I9K10 und ModeK) wurden auf Fibronektin/KollagenR-beschichteten Glasplättchen ausgesät und in Stammzell-Medium kultiviert. Es wurde nach drei Tagen mit PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit den entsprechenden primären Antikörpern gefärbt bevor der sekundäre Cy3-markierte Antikörper für eine weitere Stunde mit den Zellen inkubiert wurde. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Zellen in Einbettungsmedium mit DAPI über Nacht getrocknet und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit sekundärem Antikörper inkubiert.

3. Ergebnisse

Die Kultivierung der Zelllinien auf Standardzellkulturgefäßen im 2D-Maßstab ermöglicht keine Ausrichtung der Zellen in die apikale oder basolaterale Richtung. Aus diesem Grund wurden die Zellen auf Transwells ausgesät, sodass eine Ausrichtung und Anordnung der Zellen gefördert wurde. Exemplarisch für die Kultivierung im Transwellsystem wurden zwei generierte Zelllinien ausgewählt, um die Proteinexpression abhängig von den Kultivierungsbedingungen darzustellen (Abbildung 23).

Aus der Analyse der ZO-1-Expression des Klons I9K10 der Passage 34 wurde ersichtlich, dass die Zellen sowohl unter Standardkulturbedingungen sowie im Transwellsystem nicht in der Lage sind Zell-Zell-Kontakte auszubilden, da kein eindeutiges Signal für ZO-1 nachweisbar war. Das Protein ZO-1 konnte zwar angefärbt werden, jedoch nicht an der dafür vorgesehenen Lokalisation zwischen den Zellen, sondern eher im Zytoplasma. Auch aus der Proteinanalyse des Klons I12K2 der Passage 8 ging hervor, dass in der 2D-Kultur ein deutliches Signal für das Zelladhäsionsmolekül ZO-1 zwischen den Zellen nachweisbar war. Dies wurde auch in der Kultivierung im Transwell bestätigt. Daraus ließ sich schließen, dass bei der Transwellkultivierung zwar ein deutlich distinkteres und präziseres Signal auftrat, aber auch schon in der 2D-Kultivierung eine ZO-1 Expression zu erkennen war.

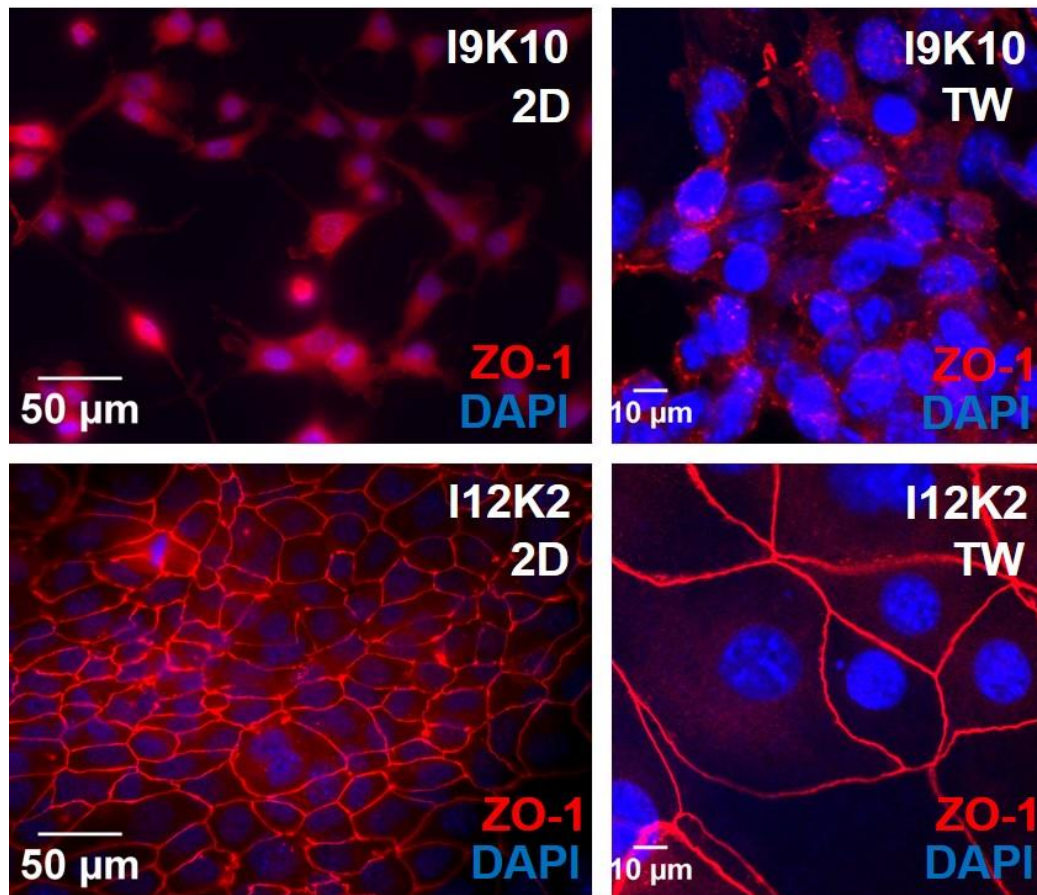


Abbildung 23: Immunzytochemie des spezifischen Epithelzellmarkers ZO-1 im Vergleich der 2D-Kultivierung mit dem Transwellsystem (TW).

Die Zellen (I9K10 der Passage 34 und I12K2 der Passage 8) wurden für die Kultivierung in 2D auf Glasplättchen ausgesät und in Transwells für die Ausrichtung in apikale und basolaterale Richtung auf ZO-1 für mehrere Tage kultiviert. Die Zellen wurden nach drei Tagen bei der 2D-Kultivierung bzw. zwei Wochen im Transwellsystem mit PBS gewaschen, Paraformaldehyd fixiert und mit Triton permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit dem primären ZO-1 Antikörper inkubiert, bevor der sekundäre Cy3-gelabelte Antikörper für eine weitere Stunde mit den Zellen zur Färbung genutzt wurde. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Zellen in Einbettungsmedium mit DAPI über Nacht getrocknet und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Aus der Analyse weiterer Klone im Transwellsystem wurde deutlich, dass Unterschiede in der ZO-1 Expression zwischen den Klonen auftraten. Es konnten Klone identifiziert werden (I9K6, I12K2 und I12K9), die ein sehr glattes Signal für die Expression von ZO-1 zeigten. Wiederum andere Klone wie I9K8 und I9K11 zeigten ein zackiges Muster bei der Expression im Transwellsystem. Wie zuvor erwähnt gab es auch Klone wie I9K10, die keine *tight junctions* ausbildeten (Abbildung 24).

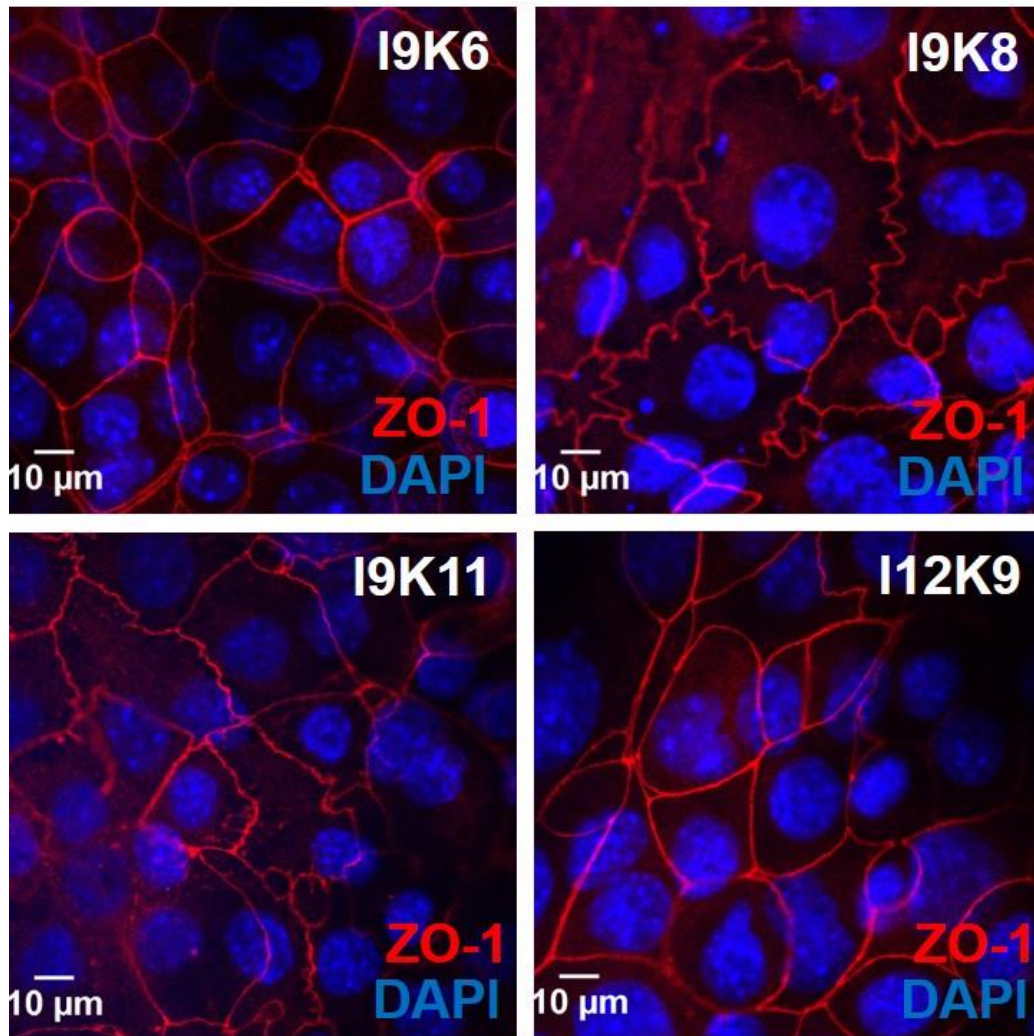


Abbildung 24: Immunfärbung auf TW exemplarischer Klone zum Nachweis der Barrierefunktion mittels ZO-1.

Die Zellen wurden in Stammzell-Medium auf Transwells ausgesät und nach ca. drei Wochen Kultivierung auf das *tight junction* Protein ZO-1 untersucht. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit TritonX permeabilisiert. Einige Klone zeigten ein eher rundes Signal (I9K6 der Passage.24 und I12K9 der Passage 10). Andere Zellen wie I9K8 der Passage 19 und I9K11 der Passage 31 zeigten ein zackenförmiges Muster der ZO-1 Expression.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die immortalisierten Zelllinien die Barrierefunktion *in vitro* nachbilden können. Hierzu wurde die Messung des transepithelialen Widerstandes zur weiteren Analyse genutzt. Dafür wurden 100.000 Zellen auf jeweils ein Transwell ausgesät und über mehrere Tage bzw. Wochen kultiviert. Um die Ausbildung einer Barriere zu messen, wurde ein Ohmmeter verwendet, welches den elektrischen Widerstand misst (Abbildung 25). Dieser Widerstand entsteht, sobald eine dichte Zellschicht auf dem Transwell ausgebildet wird und die Zellen sich apikal und basolateral ausrichten.

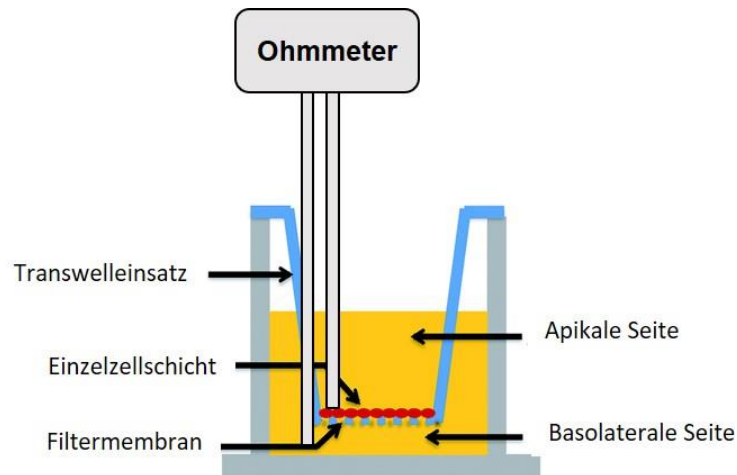


Abbildung 25: Aufbau des Transwellsystems zur Messung des TEERs.

100.000 Zellen wurden pro Well ausgesät und von apikaler als auch basolateraler Seite mit Medium beschichtet. Alle zwei Tage wurde der TEER mit dem Ohmmeter gemessen und das Medium gewechselt. Mit Zunahme der Zell-Zell-Kontakte stieg auch der TEER-Wert an.

Exemplarisch für die Ausbildung eines hohen (I12K7), mittleren (I9K17) und keines TEERs (NIH 3T3, Hepa1.6) ist die Entwicklung der Barriere über mehrere Tage in Abbildung 26 dargestellt. Es wurden Zelllinien (I12K2, I12K7, I12K9) generiert, die einen sehr hohen Widerstand ($4-6 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) ausbildeten, Zellen (I9K6, I9K8, I9K17), die einen mittleren TEER ($1-2 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) und Zellen, die keine Barriere (I9K4, I9K9, I9K10) aufzeigten. Als Kontrollzelllinien wurden murine Fibroblasten NIH 3T3 und murine Hepatozyten Hepa1.6 verwendet, die keine Barriere ausbildeten (Tabelle 29 und Abbildung 26).

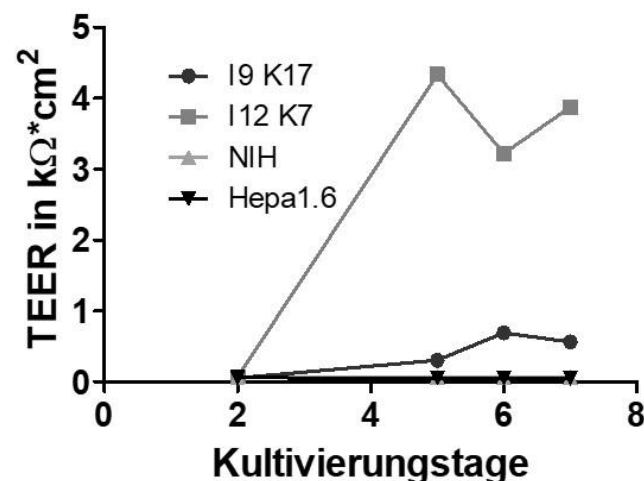


Abbildung 26: Verlauf der Widerstand-Ausbildung nach einer Woche Kultivierung.

Zu Beginn wurden 100.000 Zellen pro Transwell ausgesät und die Ausbildung des epithelialen Widerstandes beobachtet. Die Transwells wurden mit Fibronektin/KollagenR beschichtet und die Zellen im Stammzell-Medium kultiviert. Dargestellt sind exemplarisch die Kontrollzelllinien NIH 3T3 und Hepa1.6, sowie I9K17 der Passage 16 und I12K7 der Passage 6.

3. Ergebnisse

Eine Übersicht über die analysierten Darmzellen gibt Tabelle 29, wobei die meisten Klone aus der Immortalisierungsstrategie mit kombinierter 2D- und 3D-Kultivierung (I9) keinen oder nur einen sehr geringen Widerstand zeigten. Im Gegensatz dazu bildeten die Zellen aus dem Immortalisierungsansatz mit ausschließlich 2D-Kultivierung (I12) schon nach einer sehr kurzen Zeit (7 Tage) eine sehr hohe Barriere aus. Die grau hervorgehobenen Klone aus Tabelle 29 zeigen exemplarisch die Auswertung über 6 Wochen für eine mittlere Barriereausbildung (I9K6) und sehr hohe TEER-Werte (I12K2, I12K9), die sich jedoch bei mittleren Werten nach ca. 4 Wochen einpendelten. Exemplarisch für Klone, die keinen Widerstand zeigten, wurde I9K10 grau hervorgehoben, der auch nach 6 Wochen nicht in der Lage war eine Barriere zu bilden.

Tabelle 29: Übersicht der analysierten Zelllinien zur Ausbildung des TEERs über mehrere Wochen

	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	4 Wochen	5 Wochen	6 Wochen
Hepa1.6	0,06 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²		
NIH 3T3	0,05 kΩ*cm ²					
I9K2	0,06 kΩ*cm ²					
I9K4	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²		
I9K9	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²		
I9K10	0,05 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²
I9K13	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,07 kΩ*cm ²		
I9K17	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²			
I9K19	0,05 kΩ*cm ²	0,05 kΩ*cm ²	0,06 kΩ*cm ²	0,07 kΩ*cm ²		
I9K23	0,06 kΩ*cm ²					
I9K6	1,36 kΩ*cm ²	1,13 kΩ*cm ²	1,16 kΩ*cm ²	0,41 kΩ*cm ²	0,4 kΩ*cm ²	0,33 kΩ*cm ²
I9K8	0,08 kΩ*cm ²	0,2 kΩ*cm ²	0,69 kΩ*cm ²	1,19 kΩ*cm ²	2,19 kΩ*cm ²	1,82 kΩ*cm ²
I9K11	0,36 kΩ*cm ²	0,17 kΩ*cm ²	0,23 kΩ*cm ²	0,15 kΩ*cm ²	0,21 kΩ*cm ²	0,29 kΩ*cm ²
I9K15	0,06 kΩ*cm ²	0,07 kΩ*cm ²	0,11 kΩ*cm ²	0,23 kΩ*cm ²		
I9K21	0,06 kΩ*cm ²	0,11 kΩ*cm ²	0,25 kΩ*cm ²	0,47 kΩ*cm ²		
I12K2	6,6 kΩ*cm ²	5,7 kΩ*cm ²	3,2 kΩ*cm ²	1,86 kΩ*cm ²	1,98 kΩ*cm ²	0,66 kΩ*cm ²
I12K3	5,3 kΩ*cm ²					
I12K7	4,34 kΩ*cm ²					
I12K9	6,6 kΩ*cm ²	3,67 kΩ*cm ²	4,73 kΩ*cm ²	6,16 kΩ*cm ²	4,72 kΩ*cm ²	0,21 kΩ*cm ²
I12K10	4,02 kΩ*cm ²					

3. Ergebnisse

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob die immortalisierten Zellen von I12K2 als Monolayer wuchsen und somit dichte Zell-Zell-Kontakte für die dichte Barriere verantwortlich waren. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Zellen diffus durcheinander wuchsen und mehrere Zellschichten übereinander zu einem hohen TEER-Wert führten. Dafür wurde der Klon I12K2 in das Transwellsystem gebracht und für mehrere Tage bis zur vollständigen Konfluenz und Barriere-Ausbildung kultiviert. Die Oberflächenstruktur wurde von Prof. Manfred Rhode mittels Feldemissions-rasterelektronenmikroskopie (FESEM) festgehalten. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass der Klon I12K2 einige Mikrovilli auf der apikalen Seite besaß und auf basolateraler Seite die Zellen glatt waren. In Abbildung 27 waren drei aneinandergrenzende Zellen sichtbar, die besonders an den Übergängen der Zellen viele Mikrovilli zeigten. Die dichte Angrenzung der Zellen wurde über eine starke Ausprägung der Mikrovilli ersichtlich. Die Zell-Zell-Kontakte wurden durch eine weitere Vergrößerung noch besser dargestellt (Pfeil). Die Zellschicht von I12K2 wurde untersucht, indem ein Abklatsch von den Zellen gemacht wurde. Dafür wurde mit einem Klebestreifen ein Teil der Zellen entfernt. Nach der Fixierung der Zellen wurde ein anheftender Klebestreifen auf einem Teil der Zellen aufgebracht und festgedrückt. Danach wurde somit die oberste Zellschicht entfernt, um zu sehen wie viele weitere Zellschichten noch nach Entfernung des Klebestreifens anhaftend geblieben waren. Es wurde ersichtlich, dass die Zellen nicht übereinander wuchsen, sondern einen Monolayer auf dem Transwell bildeten (Abbildung 27). Die gebildeten Auswüchse (verdeutlicht mit einer Elipse) erklärten die Entstehung der sehr dichten Barriere über die Messung des TEERs, der mittels Ohmmeter im Transwellsystem gemessen wurde.

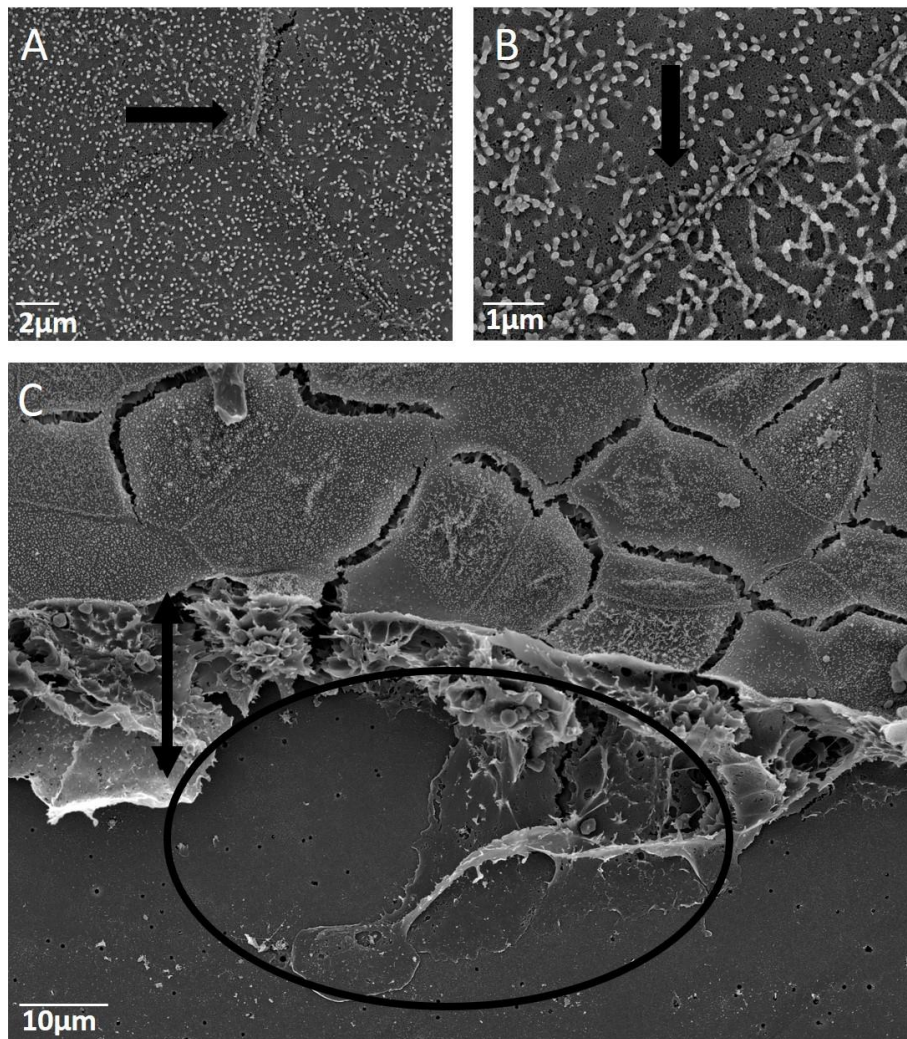


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Transwell des Klon I12K2 mit Schnitt durch die Zellebene

Der Klon I12K2 wurde für zwei Wochen im Transwellssystem kultiviert und die Ausbildung der Barriere mittels TEER-Messung verfolgt. Nach erfolgreichem Nachweis der Zell-Zell-Kontakte mittels Widerstandsmessung wurden die Zellen in Zusammenarbeit mit Prof. Manfred Rhode fixiert und die Strukturen mittels FESEM elektronenmikroskopisch aufgenommen. **(A)** Die Zellen von I12K2 zeigten enge Zell-Zell-Kontakte. **(B)** Besonders in den Grenzen zwischen einzelnen Zellen waren ausgeprägte Mikrovilli zu erkennen. **(C)** Der Abklatsch der Zellen verdeutlichte die Ausbildung eines Monolayers und die Auswüchse erklärten die Entstehung einer dichten Barriere mittels TEER-Messung.

3.4.2 Gobletzellen

Auch Becherzellen spielen eine entscheidende Rolle für ein intaktes Darmepithel, da sie die schützende Schleimschicht produzieren. Diese umgibt das Epithel und soll eindringende Bakterien bzw. Pathogene vor einer schädigenden Entzündung oder Infektion abhalten. Der Dünndarm wird von einer Schleimschicht bedeckt, welche aus dem Protein Mucin2 besteht. Dieses Protein wird durch das Muc2-Gen produziert. Diese Mucusschicht ist nicht an dem Epithel befestigt und durchlässig für Bakterien.

3. Ergebnisse

Unter anderem wurden die Eigenschaften der Becherzellen untersucht, um Zelllinien zu ermitteln, welche die entsprechenden Funktionalitäten aufweisen. Dafür wurde eine qRT-PCR-Analyse zur Quantifizierung des Gens Muc2 durchgeführt. Die Expression des Proteins Mucin2 wurde weiterhin mittels Immunfärbung sowie indirekt über eine Alcianblau-Färbung, welche die Mucusschicht anfärbt, analysiert.

Bei der Analyse von Mucin2 auf RNA-Ebene wurde deutlich, dass die untersuchten Klone keine Unterschiede in der Genexpression für Mucin2 zeigten (Abbildung 28). Es wurde nur eine sehr geringe Expression dieses Markers nachgewiesen. Normalisiert wurde die Genanalyse zum *Housekeeping*-Gen Gapdh. Verglichen zum Primärmaterial zeigten die Klone kaum eine Expression des Becherzell-typischen Gens Muc2. Die Kontrollzelllinie NIH 3T3 zeigte als Negativkontrolle keine Expression von Muc2. Die murinen IECs wiesen nur eine sehr geringe Expression des Gobletzellmarkers auf. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die meisten Klone Muc2 stärker als die Kontrollzelllinie NIH 3T3 (eine Log-Stufe), aber zwei Log-Stufen geringer als die murinen intestinalen Organoide exprimierten (Abbildung 28).

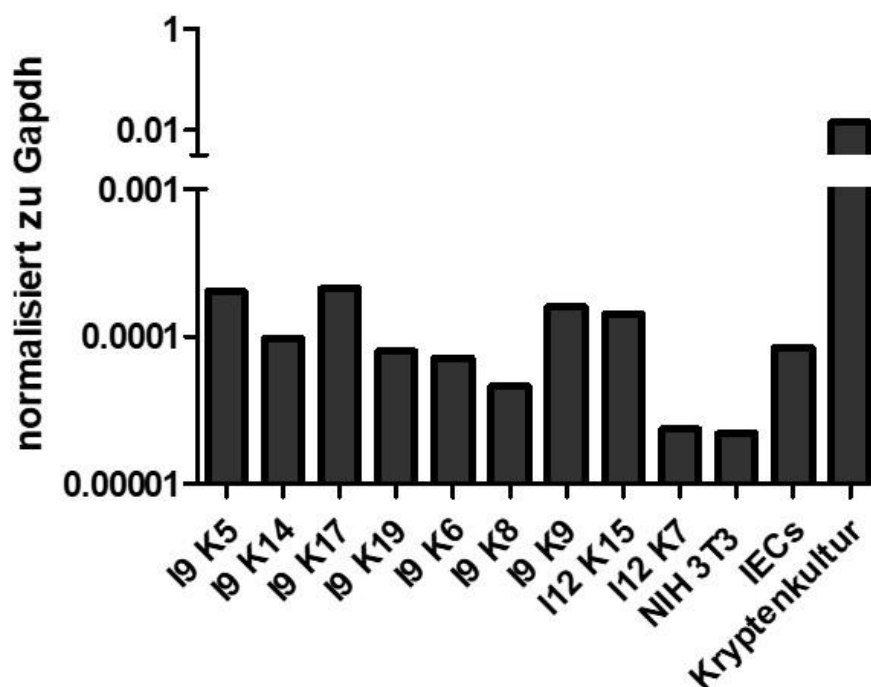


Abbildung 28: Analyse der Mucin2-Expression auf RNA-Ebene für ausgewählte Klone im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (NIH 3T3 und IECs) und des Primärmaterials.

Die Zellen wurden zuvor für einige Wochen im Stammzell-Medium kultiviert und konfluente 6 Wells zur Untersuchung Zelltyp-spezifischer Marker auf RNA-Ebene geerntet. Aus der Analyse ging hervor, dass die Klone keine Unterschiede in der Höhe der Mucin2-Expression zeigten. Im Vergleich zum Primärmaterial war die Expression sehr gering. Als Kontrollzelllinien wurden NIH 3T3 und murine IECs verwendet. Die Expression von Mucin2 wurde auf das *Housekeeping*-Gen Gapdh normalisiert.

3. Ergebnisse

Charakteristisch für Becherzellen ist die Expression des Proteins Mucin2, welches mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen wurde. Mucin2 sollte sich in den sekretorischen Vesikeln im Cytoplasma befinden. Es wurden exemplarisch verschiedene Klone (I9K6, I9K10, I12K2, I12K9) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle zur Verdeutlichung eines positiven Signals wurde die ModeK Zelllinie verwendet. Als Negativkontrolle zur Veranschaulichung eines negativen Signals wurden die murinen Fibroblasten NIH 3T3 verwendet. Für alle untersuchten Klone wurde ein Signal nachgewiesen, wobei die Negativkontrolle NIH 3T3 nur ein sehr schwaches Signal zeigte. Die Expression konnte jedoch nicht wie vermutet im Cytoplasma gezeigt werden, sondern auch in Vesikeln im Zellkern. Für die ModeK Zelllinie wurden keine angefärbten Muc2-Vesikel im Zellkern angefärbt, was darauf hinweist, dass diese Zellen ein spezifisches Signal für Mucin2 zeigten. Für die Zellen I9K6, I12K2 und I12K9 wurde ein Signal im Cytoplasma ermittelt. Der Klon I9K10 zeigte ein noch deutlicheres Signal, sodass bei dieser Zelllinie eindeutig von einer Expression des Muc2-Proteins ausgegangen wurde (Abbildung 29).

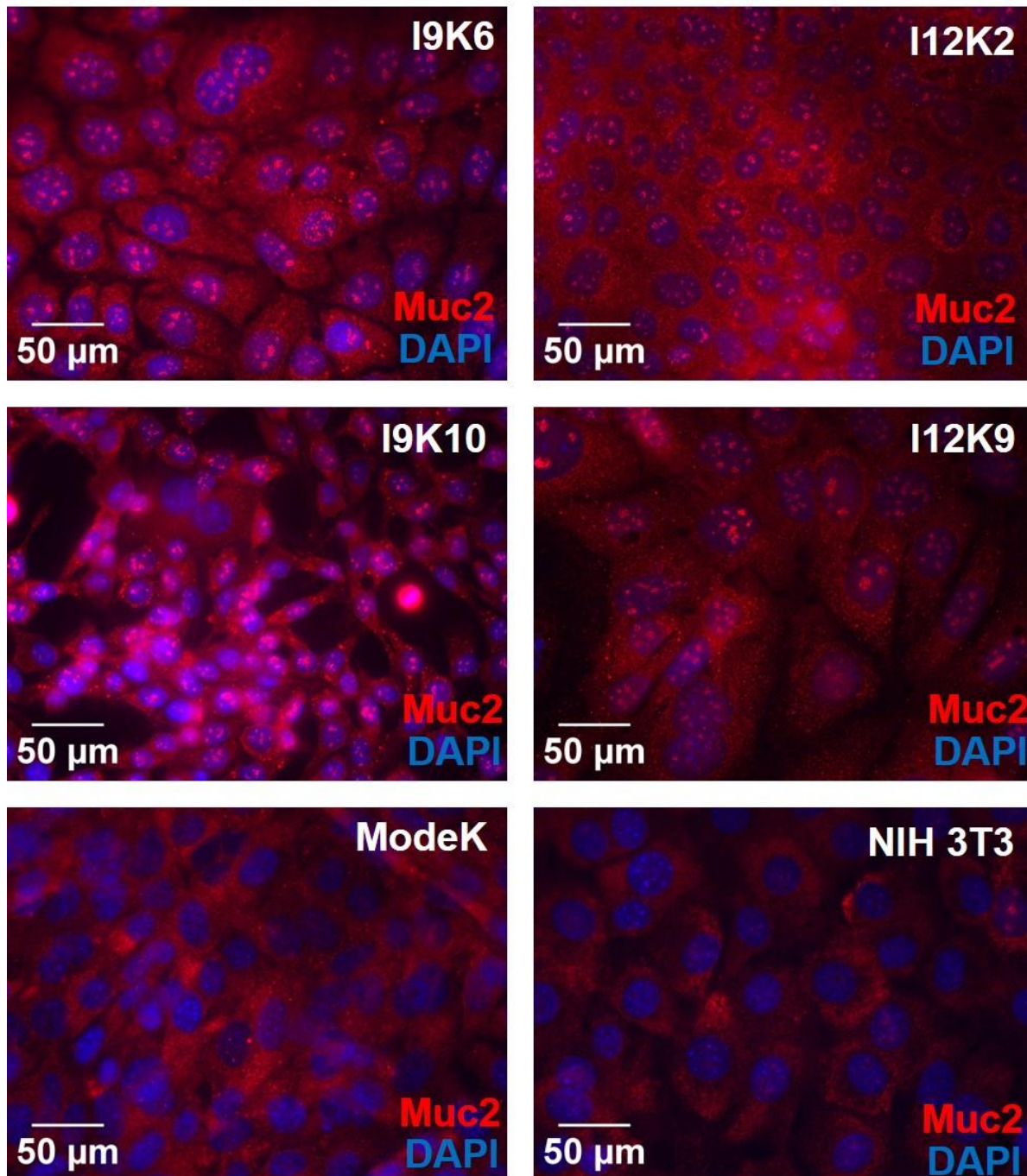


Abbildung 29: Immunfärbung des Proteins Mucin2.

Für die Analyse der Proteinexpression mittels Immunfärbung wurden die Zellen auf Glasplättchen im Stammzell-Medium kultiviert und bei vollständiger Konfluenz mittels 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung erfolgte für 1 h mit einem spezifischen Primärantikörper für Mucin2. Der Nachweis des Primärantikörpers wurde über den Cy3-markierten Sekundärantikörper ermöglicht. Dieser wurde für 1 h mit den Zellen inkubiert. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurde DAPI verwendet, wobei die Zellen mit Fluoroshield DAPI eingedeckelt wurden. Nachdem die Proben über Nacht im Kühlschrank getrocknet waren, erfolgte die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop. Als Kontrollzelllinien wurden zur Darstellung eines positiven Signals murine ModeK Zellen verwendet und zur Darstellung eines negativen Signals NIH 3T3-Zellen genutzt.

3. Ergebnisse

Nachdem die Expression des Mucins auf Proteinebene nachgewiesen wurde, wurde die Sekretion des Schleims mittels Alcianblau-Färbung analysiert. Die Schleimschicht wurde über dem Zellrasen als Blaufärbung sichtbar. Dafür wurde der Farbstoff Alcianblau verwendet, um saure Mucine hervorzuheben. Um die Zellkerne als Gegenfärbung darzustellen, wurden diese mit Kernechtrot-Färbelösung rot angefärbt. Für den Nachweis der Mucusschicht wurden exemplarisch einige Klone auf die Sekretion untersucht. Die Klone wurden über eine längere Zeit im Stammzell-Medium kultiviert und nach 2-3 Tagen vollständiger Konfluenz mithilfe von Alcianblau angefärbt.

Um einen optimalen Nachweis von Mucus zu ermöglichen, wurden zunächst verschiedene Fixierungsmethoden ausgetestet (Abbildung 30). Dabei sollte möglichst wenig des übergelagerten Schleims gewaschen werden. Grundsätzlich eigneten sich alle drei getesteten Fixierungsmethoden zur Fixierung der Schleimschicht. Zum einen wurde die Formalin-Fixierung getestet, die sich als gleichwertig gute Methode zur Methanol/Aceton-Fixierung herausstellte. Bei der Carnoy-Fixierung handelte es sich um eine zeitaufwendigere Methode, die keine deutlich besseren Ergebnisse hervorbrachte als die anderen beiden Fixierungsmöglichkeiten. Deshalb wurde die Methanol/Aceton-Fixierung als einfachste und beste Methode ausgewählt und in den folgenden Versuchen verwendet.

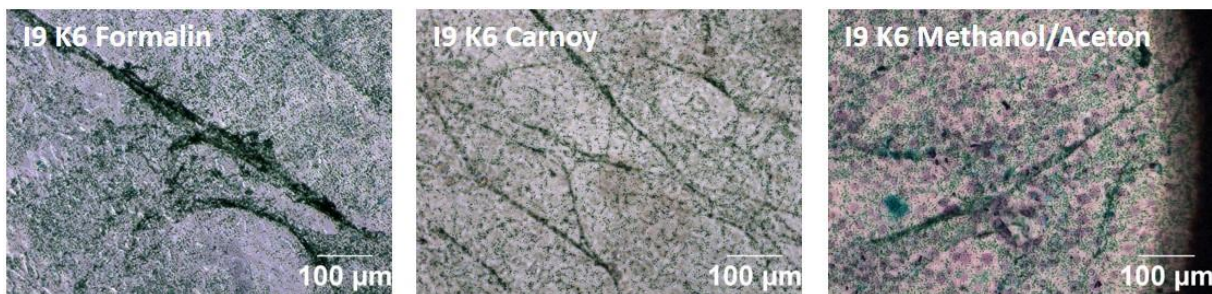


Abbildung 30: Vergleich verschiedener Fixierungsmethoden zur optimalen Anfärbung der Schleimschicht mittels Alcianblau-Färbelösung.

Der Klon I9K6 der Passage 24 wurde zuvor im Stammzell-Medium für einige Wochen kultiviert. Zum Nachweis von Mucus wurden die Zellen im konfluenten Zustand mit drei unterschiedlichen Methoden fixiert. Die Fixierung mit Formalin und Methanol/Aceton erfolgte für 10 min bei RT. Die Carnoy-Fixierung wurde für 2 h bei RT auf den Zellen angewendet.

Für die Schleimproduktion wurden als Kontrollen murine NIH 3T3, Hepa1.6 und ModeK Zellen untersucht. NIH 3T3-Zellen und murine Hepa1.6-Zellen zeigten keine Blaufärbung, sodass die Zelllinien als Negativkontrollen verwendet wurden. ModeK wurde als Positivkontrolle verwendet, da diese Zelllinie eine murine Darmzelle darstellt, die Schleim produzieren sollte.

3. Ergebnisse

Um diesen Schleim nachzuweisen, wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, mit Methanol/Aceton fixiert und mit Alcianblau-Färbung für mehrere Stunden angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte mit lichtmikroskopischen Aufnahmen, wobei der Schleim als blaue Verfärbung nachgewiesen wurde. Es wurden exemplarisch Klone ausgewählt und auf deren Mucusproduktion untersucht. Es stellte sich heraus, dass einige Klone (I9K6, I9K8, I9K10, I9K11 und I9K21) fädige Strukturen oder eine starke Blaufärbung über den Zellen zeigten. Dieser Schleim wurde für I12K2 und I12K9 nicht so ausgeprägt nachgewiesen, sondern es wurde stattdessen im Wesentlichen eine rote Färbung der Zellkerne mittels Kernechtrot erzielt. Besonders für die Klone I9K10 und I9K11 wurden diese mucusartigen Strukturen angefärbt (Abbildung 31).

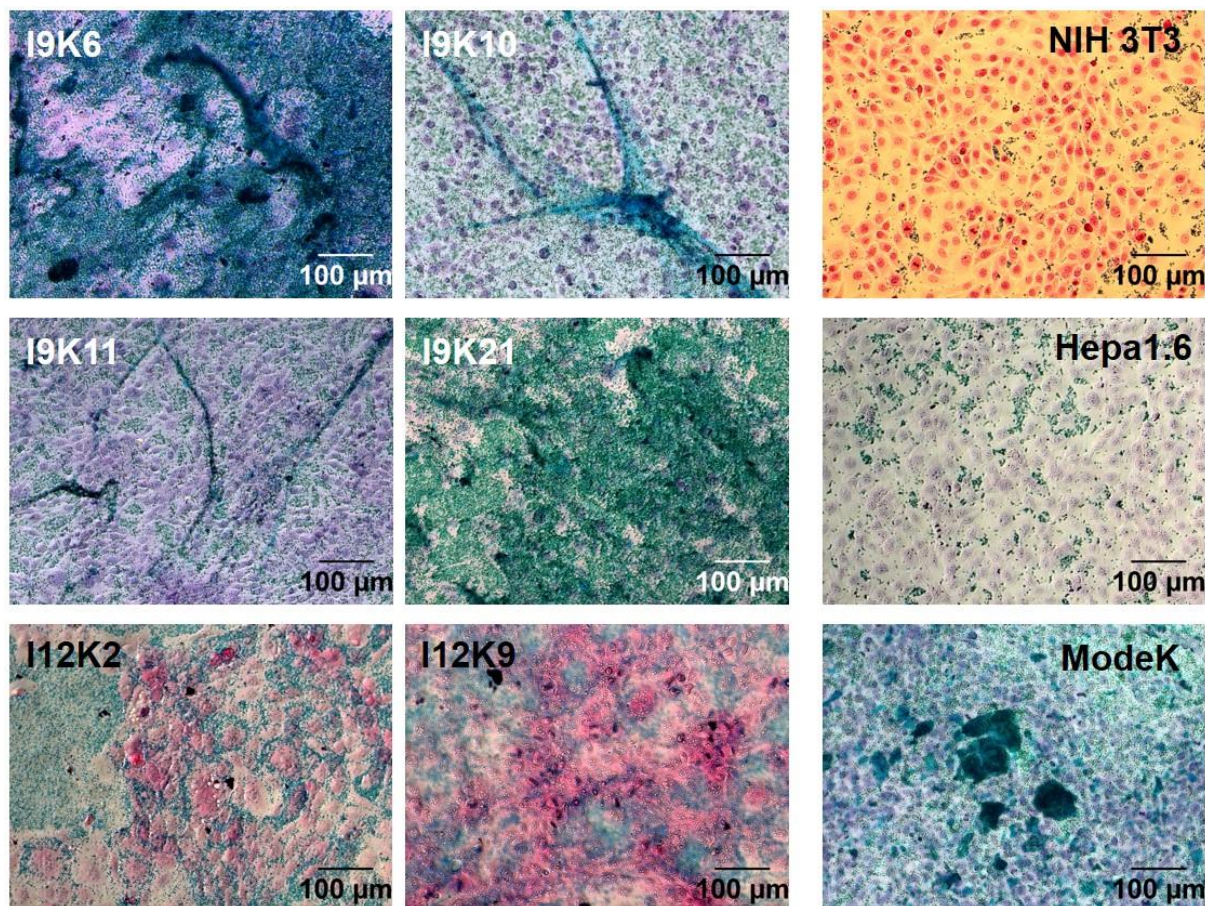


Abbildung 31: Alcianblaufärbung zur Bestimmung der Mucussekretion in Stammzell-Medium. Die analysierten Zellen wurden für längere Zeit in Stammzell-Medium kultiviert und nach 2-3 Tagen vollständiger Konfluenz auf Schleimproduktion mittels Alcianblau-Färbung untersucht. Die Zellen wurden mit Methanol/Aceton fixiert. Für I9K6 wurde Passage 24, I9K8 Passage 19, I9K10 Passage 15, I9K11 Passage 13, I9K21 Passage 14, I12K2 Passage 8 und I12K9 Passage 10 analysiert. Es zeigten sich unterschiedlich starke schleimproduzierende Klone, wobei Klone aus der Infektion I9 eine vermehrte Mucussekretion auswiesen. Im Vergleich dazu, zeigten Klone aus der Infektion I12 eine weniger ausgeprägte Schleimproduktion. Als Negativkontrollen wurden die murinen Zelllinien NIH 3T3 und Hepa1.6 Zellen verwendet. Zum Nachweis eines positiven Signals wurden die murinen ModeK Zellen benutzt.

3.4.3 Enteroendokrine Zellen

Dieser Zelltyp gehört zu den sekretorischen Zellen des Dünndarms und produziert Hormone wie z.B. Serotonin. Serotonin ist ein Neurotransmitter und Hormon, welches durch die Aktivierung der Serotoninrezeptoren seine Wirkung vermittelt. Damit wird die Peristaltik des Darms angeregt und der Nahrungsbrei kann besser verdaut werden. Außerdem löst das Hormon auch Übelkeit und Erbrechen aus bzw. leitet Schmerzen zum Gehirn weiter.

Aus diesem Grund wurde untersucht inwieweit die immortalisierten Klone Serotonin produzieren. Die Serotonin-Granula sollten sich auf basolateraler Seite ansammeln, da die Stimulation der darunterliegenden Muskelzellen über diese Seite zur erhöhten Darmmotilität führt. Dafür ist eine Ausrichtung der Zellen Voraussetzung, sodass die Kultivierung und Analyse in dem Transwellsystem gewählt wurde.

Die Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro Transwell ausgesät und zunächst über zwei Wochen in diesem System kultiviert. Dabei wurde zweitägig das Medium gewechselt und der transepitheliale Widerstand gemessen, um eine Ausrichtung der Zellen nachzuverfolgen. Nach der mehrwöchigen Kultivierung im Transwellsystem wurde nach 24 h bzw. 72 h der Überstand sowohl apikal als auch basolateral abgenommen und mithilfe eines ELISA die Serotonin-Konzentration ermittelt (Abbildung 32). Als Negativkontrolle wurde Überstand von murinen Hepa1.6-Zellen verwendet, da die Hepatozyten kein Serotonin sekretieren sollten. Außerdem wurde das Stammzell-Medium mittels ELISA analysiert, um auszuschließen, dass es kein Serotonin enthält. Zur Quantifizierung der Serotoninproduktion wurde als Positivkontrolle Serotonin mit einer Konzentration von 100 ng/ml analysiert. In diesen Untersuchungen wurden 6 exemplarisch ausgewählte Klone auf die apikale und basolaterale Serotonin-Sekretion untersucht. Es wurde deutlich, dass sowohl apikal als auch basolateral Serotonin nachweisbar war. Klone wie I9K6, I9K8, I9K11, I12K2 und I12K9, die eine Barrierefunktion zeigten und somit Zell-Zell-Kontakte ausbildeten, waren in der Lage Serotonin gerichtet zu sekretieren. Dabei wurde deutlich, dass I9K11, I12K2 und I12K9 mehr Serotonin auf der basolateralen Seite sekretierten als auf der apikalen Seite. I9K10 bildete keine dichten Zell-Zell-Kontakte aus und wies auch keine gerichtete Serotonin-Sekretion auf.

Nach 24 h wurden ca. 100-150 ng/ml Serotonin basolateral sekretiert. Nach 72 h wurde nur eine geringe Steigerung der Serotonin-Konzentration deutlich. Dies war

3. Ergebnisse

vermutlich auf den starken Verbrauch des Mediums und die kurze Halbwertszeit des Hormons zurückzuführen.

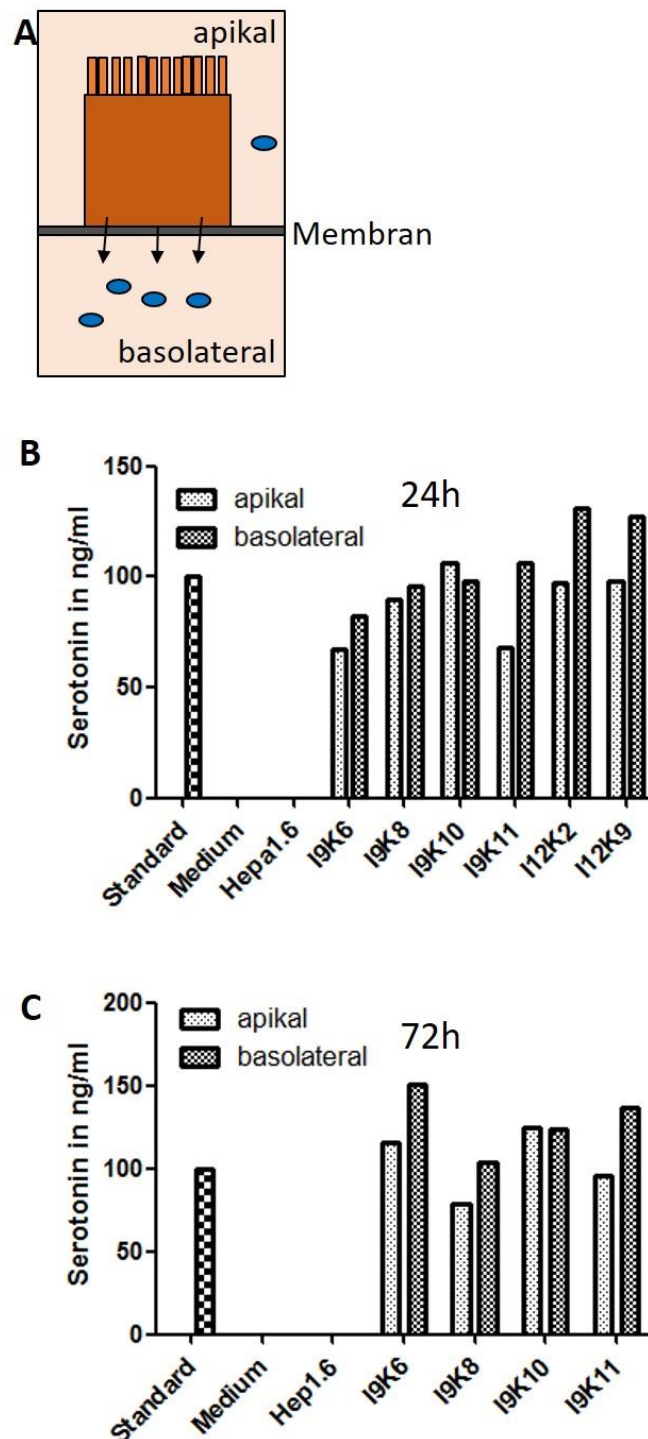


Abbildung 32: Analyse der Serotonin-Sekretion im Transwellsystem für exemplarisch ausgewählte Klone.

Die Zellen wurden für mehrere Wochen auf einem Transwell kultiviert, um den Zellen eine Ausrichtung in apikale und basolaterale Richtung zu ermöglichen. Dafür wurden 100.000 Zellen pro Well ausgesät und jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und der TEER wurde gemessen. Nach erfolgtem Mediumwechsel wurden nach 24 h bzw. 72 h die Überstände sowohl auf apikaler als auch basolateraler Seite abgenommen und mittels Serotonin-ELISA analysiert. Der Serotonin-Gehalt wurde bestimmt, indem dieser spektrophotometrisch vermessen wurde.

Typisch für die Enteroendokrinen Zellen des Dünndarms ist die Expression von ChromograninA, welches in Vesikeln enthalten ist. ChromograninA kommt als häufigstes Granin in den enteroendokrinen Zellen vor. Es ist an der Hormonreifung und Hormonsekretion beteiligt und kann zu einem biologisch aktiven Peptid gespalten werden. Außerdem ist ChromograninA am direkten Aufbau von Speichervesikeln beteiligt.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Expression des ChromograninA in den neu generierten Zelllinien nachweisbar war. Dafür wurde die RNA von zweidimensional kultivierten Zellen aufgereinigt und die umgeschriebene cDNA mittels qRT-PCR quantitativ analysiert. Als Kontrollen wurden murine NIH 3T3 Zellen verwendet, die keine Expression zeigen sollten. Außerdem wurden IECs als Referenzzelllinie auf ihre Expression untersucht, sodass eine bessere Einordnung der Expressionshöhen erfolgen konnte. Als Positivkontrollen wurde das murine intestinale Kryptenmaterial verwendet, um zu analysieren, ob ähnliche Expressionshöhen zu den primären Krypten erreicht wurden. Dabei war jedoch zu beachten, dass die Zellen in 3D-Umgebung kultiviert wurden, wohingegen die Klone zweidimensional vor der Analyse expandiert wurden. Die generierten Klone bildeten kaum ChromograninA verglichen zu den primären intestinalen Kryptenkulturen. Außerdem zeigten die Klone ähnliche Expressionshöhen bzw. keine Expression von ChromograninA verglichen mit der verwendeten NIH 3T3-Kontrolle (Abbildung 33).

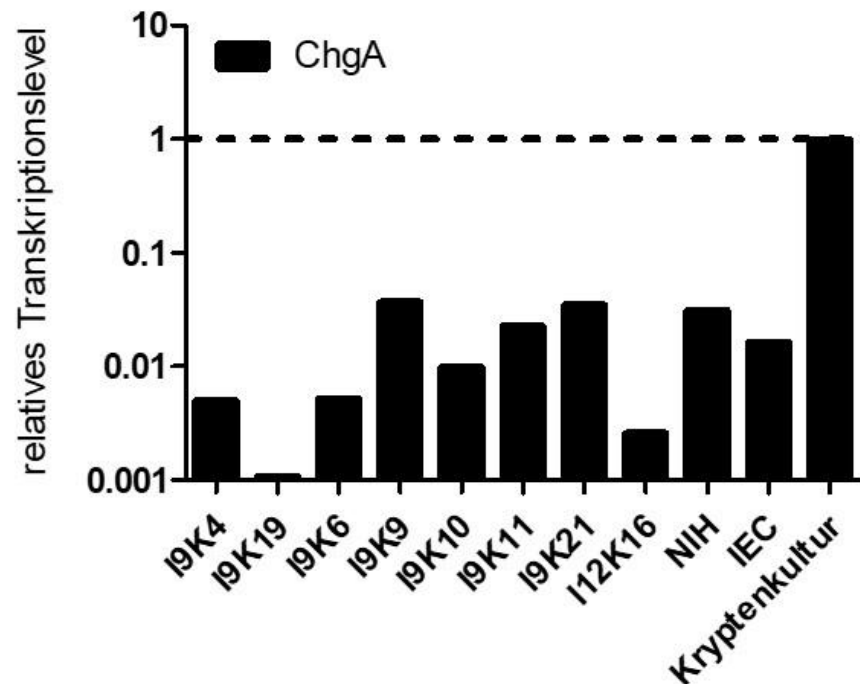


Abbildung 33: Expression des enteroendokrinen Markers ChromograninA normalisiert zur murinen intestinalen Kryptenkultur.

Die generierten Klone wurden vor der RNA-Isolation bis zur Konfluenz im Stammzell-Medium kultiviert und danach die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Die generierte cDNA wurde mittels qRT-PCR auf die quantitative Expression des enteroendokrinen Markers ChromograninA analysiert. Die Auswertung erfolgte über die Normalisierung zu den murinen intestinalen Krypten. Als Negativkontrollen wurden die murinen NIH 3T3 und IECs verwendet, um eine bessere Einordnung der klonalen Expressionshöhen zu ermöglichen.

3.4.4 Panethzellen

Panethzellen sitzen in der Nähe der Stammzellen in den Krypten, da sie antimikrobielle Peptide wie z.B. Lysozym oder Defensin sekretieren, um die Stammzellen zu beschützen. Es wurden exemplarisch einige Klone ausgewählt und auf die Expression von Defensin5 und Lysozym untersucht, wobei als Referenzzelllinie die murinen IECs verwendet wurden. Defensine sind Peptide, die der unspezifischen Immunabwehr zugeordnet werden können und der Abwehr von Krankheitserregern dienen. Lysozym besitzt eine antimikrobielle Wirkung, indem es die Zellwand der Bakterien permeabel macht.

Für die Analyse wurde aus den zweidimensional kultivierten Zelllinien RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert, wobei als Normalisierung die murinen IECs verwendet wurden. Aus der Analyse wurde deutlich, dass die generierten Klone mehr (1,5 Log-Stufen) Defensin5 bildeten als die Referenzzelllinie IEC. Gleichzeitig zeigten die generierten Zelllinien geringere Expressionshöhen

3. Ergebnisse

verglichen zu den murinen intestinalen Kryptenkulturen, die eine signifikant höhere Expression (2 Log-Stufen stärker) des Defensins zeigten (Abbildung 34). Außerdem konnte zwischen den immortalisierten Zellen kein deutlicher Unterschied in der Defensin-Expression ermittelt werden. Für die Expression des zweiten Panethzellmarkers Lysozym wurde keine überzeugende Expression für die generierten Zellklone ermittelt, da nur ein geringes Signal ähnlich zur Referenzzelllinie IEC deutlich wurde. Dabei unterschieden sich die immortalisierten Zellen untereinander, da I9K4 und I12K23 eine ca. 1,5 Logstufen höhere Expression von Lysozym zeigten im Vergleich zu IEC. Für die murinen intestinalen Kryptenzellen wurde ein hohes Signal für Lysozym analysiert, wobei die generierten Zelllinien 2-3 Log-Stufen weniger Lysozym-Expression zeigten. Zusammenfassend wurde Defensin5 ca. 2 Logstufen niedriger verglichen zum Ausgangsmaterial exprimiert und verglichen zu den IECs eine 1,5 Logstufen höhere Defensin5-Expression. Lysozym wurde nur von zwei verschiedenen Klonen exprimiert, wobei die primären Kryptenzellen 2 Logstufen mehr Lysozym zeigten (Abbildung 34).

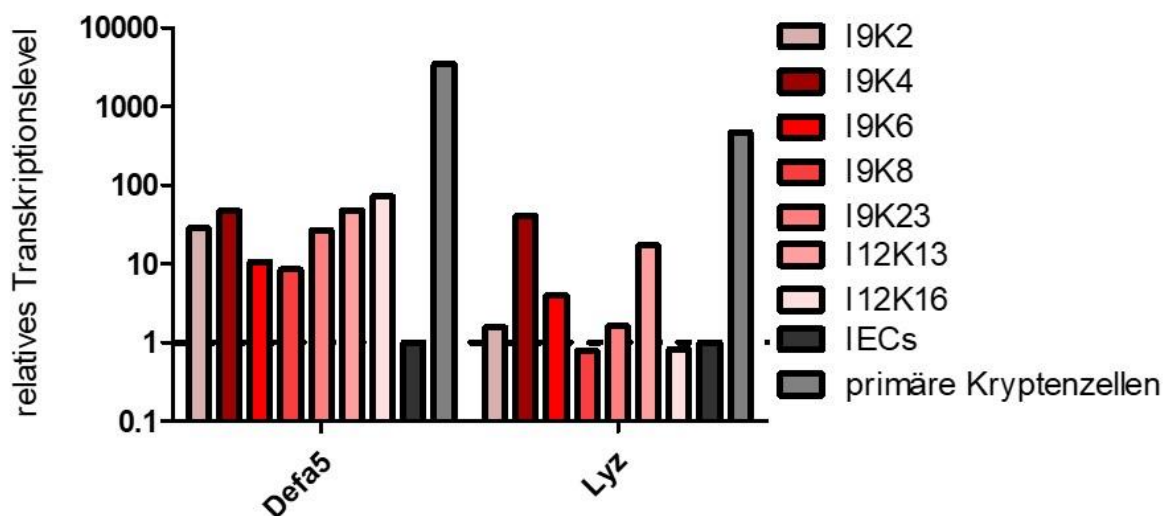


Abbildung 34: Expression der Panethzellmarker Defensin5 und Lysozym1 normalisiert zu den IECs.

Die Zellen wurden für mehrere Tage in Stammzell-Medium vermehrt und die RNA vom konfluenten 6 Well isoliert. Für die primären Kryptenzellen wurden die Zellen aus der 3D-Kultur herausgelöst und die RNA isoliert. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primerpaare für Defensin5 (Defa5) und Lysozym (Lyz) über qRT-PCR-Analyse untersucht. Als Referenzzelllinie dienten murine IECs und die murine intestinale Kryptenkultur.

Ein weiterer Marker für Panethzellen ist CD24, welches ein Oberflächenprotein und speziell ein Zelladhäsionsmolekül darstellt. Die generierten Zelllinien wurden exemplarisch auf die Expression diesen Markers mittels Durchflusszytometrie

3. Ergebnisse

untersucht. Dafür wurden die Zellen für mehrere Wochen im Stammzell-Medium kultiviert und mit einem spezifischen Antikörper gegen CD24 angefärbt, der über einen zweiten Cy3-Antikörper nachgewiesen wurde. Es wurde deutlich, dass I9K10 keine Expression des Panethzellmarkers CD24 zeigte, I9K6 positiv für die Expression des Oberflächenproteins war, obwohl die Zellen eine heterogene Expression zeigten. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass es sich nicht um klonale Zellen handelte, sondern wahrscheinlich eher um eine heterogene Mischung aus den verschiedenen Dünndarmzellen. Andere Klone wie I12K2 zeigten eine eindeutige Expression von CD24 (Abbildung 35).

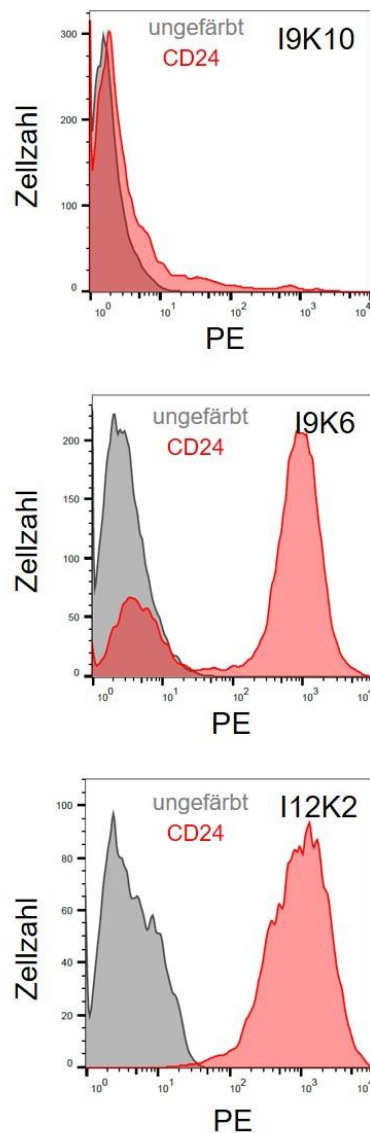


Abbildung 35: Expression des Panethzellmarkers CD24.

Die Zellen wurden über mehrere Wochen im Stammzell-Medium kultiviert und auf den spezifischen Panethzellmarker CD24 durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden die Zellen mit einem Primärantikörper gegen CD24 für 1 h bei RT inkubiert und danach für eine weitere Stunde bei RT mit einem Cy3-markierten Sekundärantikörper. Als Kontrolle wurden die Zellen ungefärbt vermessen.

3.5 3D-Entwicklung der Klone in Matrigel und Analyse Zelltyp-spezifischer Marker auf RNA-Ebene

Für die funktionale Analyse der generierten Zellen aus dem murinen Dünndarm wurde untersucht, ob die immortalisierten Zellen weiterhin in der Lage waren in 3D-Kultivierung, die normalerweise für die Kultivierung von Organoiden verwendet wird, weiterhin Organoid-Strukturen auszubilden. Hiermit sollte untersucht werden, ob mit dieser entsprechenden Kultivierung die immortalisierten Zelllinien das Potential besitzen in die verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (Panethzellen, Enteroendokrine Zellen, Becherzellen, Enterozyten).

Für das Primärmaterial der murinen intestinalen Kryptenkultur wurde gezeigt, dass nach der Entstehung von Sphäroiden bzw. Organoiden die Zellen weiter in komplexe Krypten-Strukturen differenzierten. Aus diesem Grund wurden verschiedene immortalisierte murine intestinale Zelllinien in die 3D-Umgebung mittels Matrigel ausgesät und für drei Wochen auf die Ausbildung spezifischer 3D-Strukturen analysiert. Einige Klone wie z.B. I9K5, zeigten keine Organoid-Bildung, sondern Zellaggregate ohne distinkte Abgrenzung (Abbildung 36). Außerdem wurden Zelllinien generiert wie I9K6, die kleine Sphäroide nach 21 Tagen bildeten. Wiederum andere Klone (I9K26) zeigten eine Sphäroid-ähnliche Struktur, die sich aber vom ursprünglichen Material unterschied. Weitere Klone wie I12K16, I12K9 und I12K7 zeigten weitestgehend eine einheitliche Sphäroid-Bildung ähnlich zu den murinen intestinalen Organoid-Kulturen.

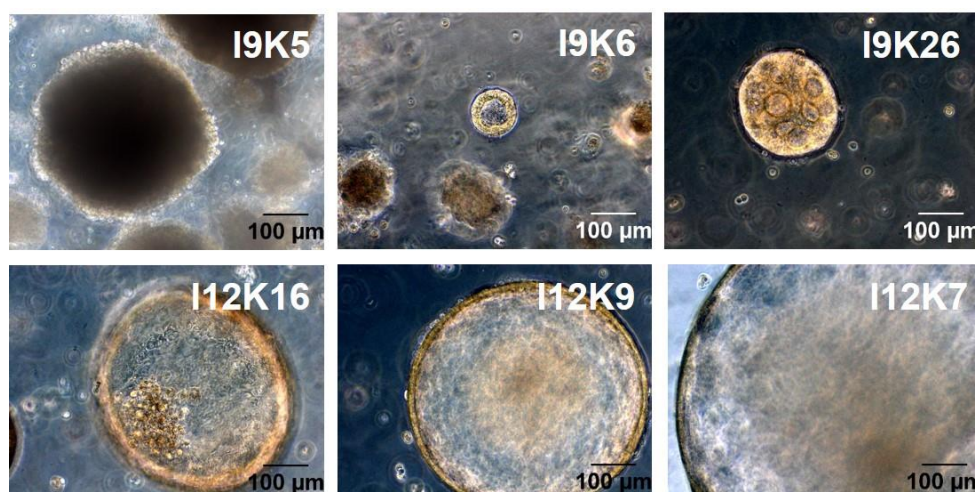


Abbildung 36: Darstellung der 3D-Struktur nach 21 Tagen Kultivierung in Matrigel

Die Zellen aus der Infektion I9 wurden in der Passage 13 analysiert und Klone aus der Infektion I12 in der Passage 5 untersucht. Dafür wurden die immortalisierten Darmzellen aus der 2D-Umgebung abgelöst und in Matrigel zur 3D-Kultivierung ausgesät. Alle zwei Tage wurde das Stammzell-Medium gewechselt und nach 21 Tagen zeigten die Klone Unterschiede in der Sphäroid-Bildung.

3. Ergebnisse

Um die Entstehung der 3D-Strukturen genauer anzuschauen, wurde der zeitliche Verlauf über drei Wochen mikroskopisch verfolgt (Abbildung 37). Es wurde für einige Klone wie beispielsweise I12K2 die Sphäroid-Bildung beobachtet, wohingegen andere Klone wie z.B. I9K8 zwar runde Zellansammlungen zeigten, aber keine abgegrenzte Sphäroid-Struktur. Die zeitliche Entwicklung über 3-4 Wochen in Abbildung 37 zeigte für I9K8 eine Proliferation der Zellen, wobei eine dichte Ansammlung von Zellen entstand, aber keine distinkte Sphäroid-Bildung. Für den zeitlichen Ablauf der Organoid-Bildung nach 4 Wochen für I12K2 wurde eine Primär-ähnliche Sphäroid-Entstehung nachgewiesen. Nach ca. 2,5 Wochen entstanden runde Anordnungen der Zellen. Nach einer Kultivierungsdauer von knapp vier Wochen konnte beobachtet werden, dass einige Zellen aus den Organoiden herauswuchsen und eine adhärenzte Proliferation aufwiesen (Abbildung 37, I12K2).

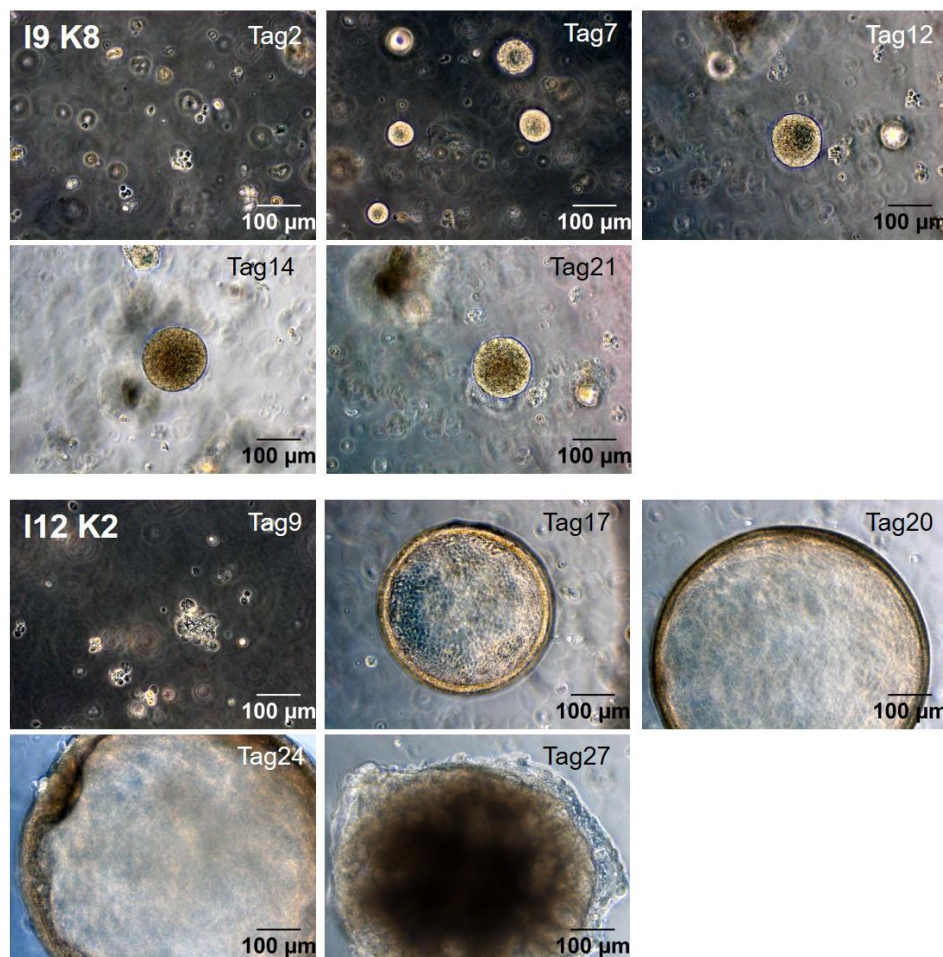


Abbildung 37: Entwicklung der 3D-Strukturen nach 3-4 Wochen Kultivierung in Stammzell-Medium

Exemplarisch sind zwei Klone gezeigt, die unterschiedliche Sphäroid-Bildung zeigten. Die zeitliche Entwicklung der Sphäroide für I9K8 in der Passage 8 und I12K2 in der Passage 5 wurden für 21 Tage bzw. 27 Tage untersucht. Die Zellen wurden aus der 2D-Kultivierung abgelöst und in Matrigel ausgesät, um die Ausbildung der 3D-Strukturen nachzuverfolgen. Dafür wurden alle zwei Tage die Zellen mit frischem Medium versorgt und mikroskopische Aufnahmen gemacht.

3. Ergebnisse

Tabelle 30 zeigt zunächst die Organoid-Bildung im Stammzell-Medium der untersuchten immortalisierten Zelllinien. Ein Drittel der generierten Zellen zeigten keine Organoid-Bildung, wohingegen zwei Drittel in der Lage waren Organoid-Strukturen auszubilden. Zellen, die nur in Zellansammlungen im Matrigel wuchsen, sind in Rot dargestellt und runde Organoid-Strukturen sind in Tabelle 30 mit Grün markiert.

Tabelle 30: Organoid-Bildung der generierten Zelllinien nach 1-2 Wochen Kultivierung in Stammzell-Medium. Grün bedeutet eine Organoid-Bildung, wobei die rot markierten Zelllinien keine Organoide in Matrigel-Kultivierung zeigten.

Infektion I9	Organoid-Bildung	Infektion I12	Organoid-Bildung
I9K1		I12K1	
I9K2		I12K2	
I9K4		I12K3	
I9K5		I12K4	
I9K6		I12K5	
I9K8		I12K6	
I9K9		I12K7	
I9K10		I12K9	
I9K11		I12K10	
I9K12		I12K12	
I9K13		I12K13	
I9K15		I12K14	
I9K16		I12K15	
I9K17		I12K16	
I9K18			
I9K19			
I9K20			
I9K21			
I9K23			
I9K24			
I9K26			
I9K27			

3.6 Zelloberfläche

Die Oberflächenstruktur der Zellen kann Aufschluss über funktionelle Eigenschaften geben. Deshalb wurden die Klone elektronenmikroskopisch untersucht und die Oberflächenbeschaffenheit analysiert. Zum Beispiel können über die Topologie der Zellen Zusammenhänge zur Barrierefunktion bzw. Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten identifiziert werden. Exemplarisch wurden einige Klone elektronenmikroskopisch analysiert. Dabei wurde deutlich, dass Klone generiert wurden, die eine diffuse Oberflächenstruktur mit vielen Mikrovilli zeigten und keine Zell-Zell-Kontakte ausbildeten (I9K10). Einhergehend mit fehlenden Zell-Zell-Kontakten korrelierte diese Beobachtung auch mit der fehlenden Barrierefunktion der immortalisierten Zelllinie I9K10. Andere Klone wie I9K11 zeigten dichte Zell-Zell-Kontakte und weniger Mikrovilli auf ihrer Oberfläche. Demgegenüber wurden mit den Klonen I12K9 und I12K10 Klone identifiziert, die sowohl dichte Zell-Zell-Kontakte als auch Mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen aufwiesen (Abbildung 38). Zum Vergleich wurden murine NIH 3T3-Zellen und murine ModeK Zellen betrachtet. Es wurde ersichtlich, dass weder ModeK noch NIH 3T3 Monolayer ausbildeten, sondern mehrere Zellschichten übereinander wuchsen. Dies wurde für I9K11 beispielsweise nicht beobachtet, da die Zellen dicht aneinanderwuchsen und eindeutige Zellabgrenzungen sichtbar waren (Abbildung 38).

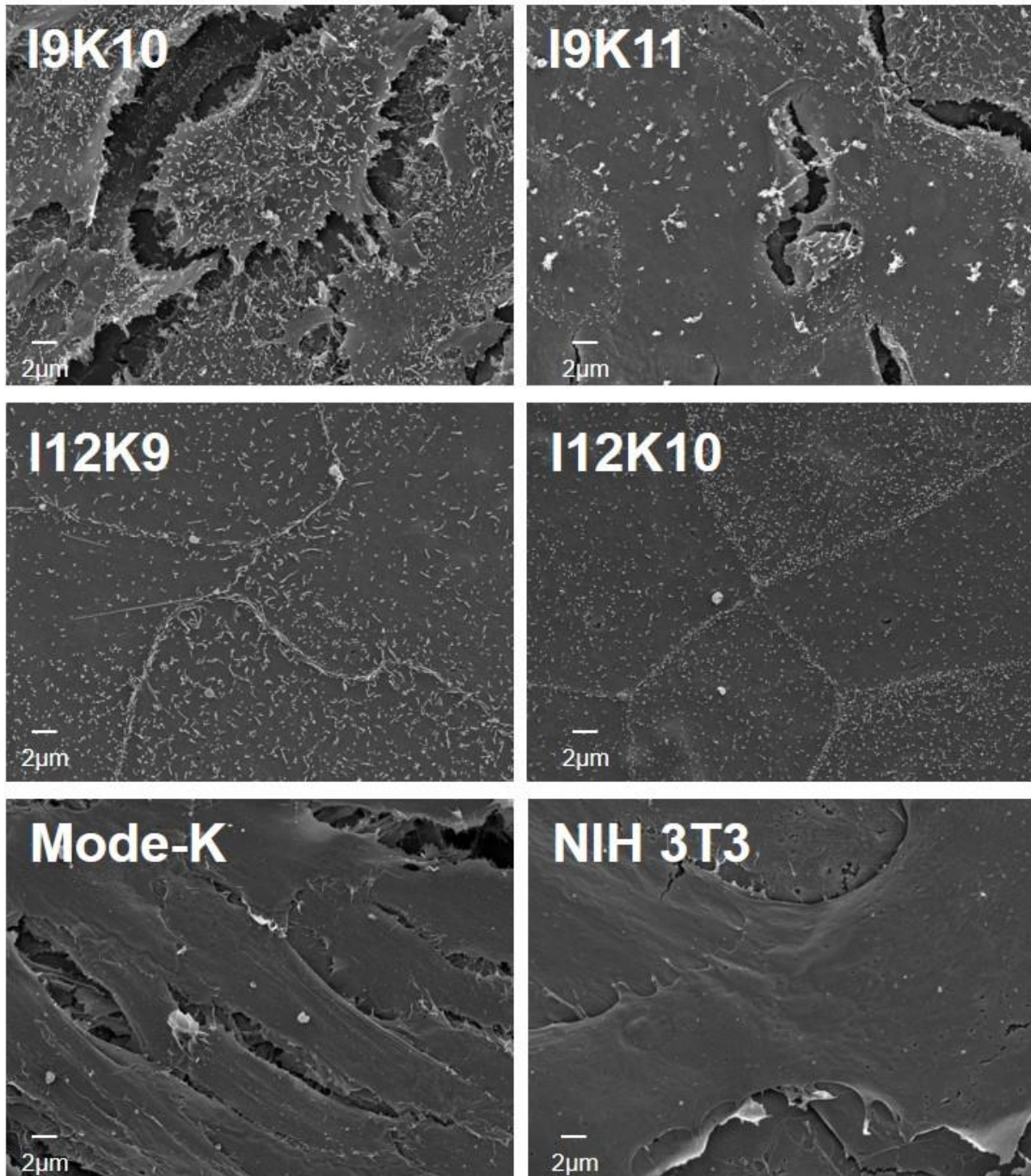


Abbildung 38: Oberflächenstrukturen von generierten Zelllinien und ModeK sowie NIH 3T3

Zur Untersuchung der Zelloberflächen der immortalisierten Zelllinien (I9K10, I9K11, I12K9 und I12K10) sowie ModeK Zellen und NIH 3T3 wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Bilder von den Zelloberflächen wurden mittels Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie (FESEM) in Zusammenarbeit mit Prof. Manfred Rohde (HZI) und Dr. Julia Horstmann (HZI) aufgenommen.

3.7 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Für die Handhabung der generierten Zelllinien wurde nachfolgend eine Optimierung bezüglich des verwendeten Kultivierungsmediums durchgeführt. Dies hatte zum einen den Grund, da das verwendete murine Stammzell-Medium sehr kostenintensiv ist und zum anderen die Inhaltsstoffe dieses Mediums nicht offengelegt werden.

Daher wurde versucht ein eigenes Medium für die Standardkultivierung zu etablieren. Neben geringeren Kosten sollte mit diesem selbst entwickelten Medium vor allem sichergestellt sein, dass alle Medienzusätze bekannt sind und gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt präzisere Modifikationen durchgeführt werden können. Bei Verwendung des selbst entwickelten Mediums sollten möglichst alle Zelltyp-spezifischen Eigenschaften erhalten bleiben, um die Funktionalität der Zellen weiterhin zu gewährleisten. Als Funktionen, die erhalten bleiben sollten, wurden zum einen die Ausbildung der Barriere sowie die Proteinexpression von Mucin2 und die Mucusproduktion herangezogen.

Für die Funktionsanalyse nach der Veränderung des Mediums wurde als Zwischenschritt zunächst ein anderes Grundmedium (H/D-Medium) genutzt, um die schrittweise Supplementation mit dem Stammzell-Medium zu untersuchen. Es sollte analysiert werden, ab welcher Konzentration des Stammzell-Mediums eine Veränderung der Proteinexpression erfolgte. Dafür wurde die Proteinexpression mittels Immunfärbung auf Mucin2 analysiert. Dabei wurde abhängig vom prozentualen Anteil des Stammzell-Mediums gezeigt, dass eine höhere Proteinexpression von Mucin2 beobachtet wurde. Bei einer Stammzell-Medium-Konzentration von 1/100 wurde keine Expression von Mucin2 mehr nachgewiesen. Dies wurde auch durch die Analyse der Mucussekretion mithilfe der Alcianblau-Färbung deutlich. Eine signifikante Produktion des Mucus wurde lediglich bei unverdünntem Stammzell-Medium sowie bei einer 1/10 Verdünnung nachgewiesen (Abbildung 39). Aus den Morphologie-Bildern ging hervor, dass nach einer Kultivierung von 9 Tagen in verringerter Konzentration des Stammzell-Mediums die Fortsätze an den Zellen I9K10 kürzer wurden. Zusammenfassend wurde mit abnehmender Konzentration des Stammzell-Mediums und dementsprechend auch einer verringerten Konzentration der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren auch eine verringerte Mucus-Produktion beobachtet.

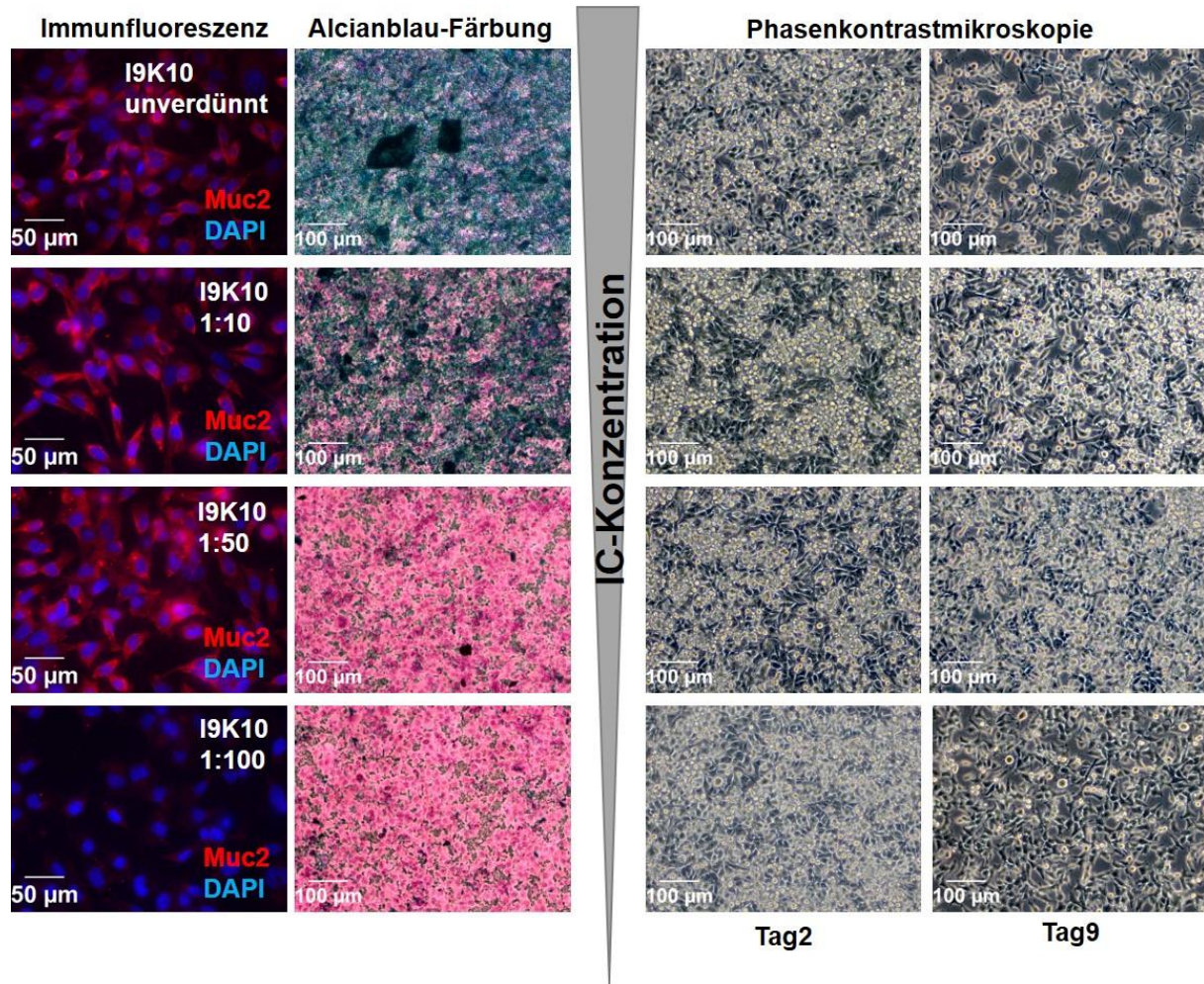


Abbildung 39: Funktionale Analyse der Mucusproduktion in Medium mit abnehmender Konzentration des Stammzell-Mediums.

Für die Untersuchung des Medieneinflusses auf die Mucus-Produktion wurden die Zellen im Stammzell-Medium sowie bei abnehmender Konzentration des Stammzell-Mediums eine Woche kultiviert und untersucht. Es wurde I9K10 der Passage 23 exemplarisch analysiert. In der oberen Reihe wurden die Zellen in unverdünntem Stammzell-Medium dargestellt. In den darunterliegenden Reihen nimmt die Konzentration des Stammzell-Mediums ab (1:10, 1:50, 1:100). Zum einen wurde über die Immunfärbung und zum anderen über Alcianblau-Färbung die Expression von Mucin2 bzw. die Mucus-Produktion untersucht. Weiterhin wurde die Veränderung der Morphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie betrachtet.

Diese Daten deuteten darauf hin, dass für den vollständigen Funktionserhalt der immortalisierten Zelllinien ein Kultivierungsmedium benötigt wird, welches bestimmte Wachstumsfaktoren des Stammzell-Mediums enthält. Daher wurde für 6 verschiedene Medien (Airway, DMEM3+, H/D, H/Dadvanced, IEC und Stammzell-Medium) getestet inwieweit diese die Morphologie und die Proliferationseigenschaften der immortalisierten Zelllinien beeinflussen. Sowohl das Airway als auch das IEC-Medium wurden verwendet, da sie für die Kultivierung von Epithelzellen geeignet sind (Lungenepithelzellen-Airway, murine embryonale intestinale Epithelzellen-IEC). DMEM3+ sowie das H/D sind Standardmedien, die für eine Vielzahl von

3. Ergebnisse

Standardzellen wie NIH 3T3 oder ModeK verwendet werden. Zusätzlich wurde das H/Dadvanced-Medium entwickelt.

Das H/Dadvanced-Medium enthält neben dem Rock-Inhibitor (Y-27632) und EGF, N-Acetylcystein, B27- und N2-Zusatz. Der B27-Zusatz enthält Biotin, eine Vitamin E-Form (DL Alpha Tocopherol Acetat), Vitamin A, BSA, Katalase, humanes rekombinantes Insulin, humanes Transferrin, Superoxid-Dismutase, das Steroidhormon Corticosteron, D-Galactose, Ethanolamin, reduziertes Glutathion, die chemische Verbindung L-Carnitin, die Fettsäuren Linolsäure und Linolensäure, das Hormon Progesteron, das Polyamin Putrescin, Natriumselenit und das Hormon T3 (Triiodo-L-Thyronin). Der zweite Medienzusatz N2 setzt sich aus humanem Holo-Transferrin, Insulin, Progesteron, Putrescin und Selenit zusammen.

Es stellte sich heraus, dass die Zellen neben der Kultivierung im Stammzell-Medium auch eine starke Proliferation im selbst entwickelten H/Dadvanced-Medium aufzeigten. Die Morphologien aus Abbildung 40 unterschieden sich deutlich in Abhängigkeit des verwendeten Kultivierungsmediums. Eine ähnliche Morphologie wurde in Airway und DMEM3+-Medium beobachtet. Es war zu erkennen, dass die Zellen zwar Zell-Zell-Kontakte ausbildeten, aber leicht unterschiedliche Größen zeigten. Besonders deutlich wurde dies in DMEM3+, wobei einerseits die Zellen dicht aneinanderwuchsen und in anderen Bereichen deutlich größere Zellen auftauchten. Im verwendeten H/D- Medium sowie IEC-Medium sahen die Zellen sehr klein und dicht aneinander gewachsen aus. Die morphologische Struktur war eher kopfsteinpflasterartig einzuordnen. Im Stammzell-Medium ordneten die Zellen sich länglicher aneinander an, wobei sie dennoch einen dichten Zellrasen bildeten. Im H/Dadvanced-Medium war wiederum eine länglichere Morphologie der Zellen zu beobachten, die eher dem Stammzell-Medium ähnelte, wobei hierbei die Zellen scheinbar weniger Zell-Zell-Kontakte ausbildeten.

3. Ergebnisse

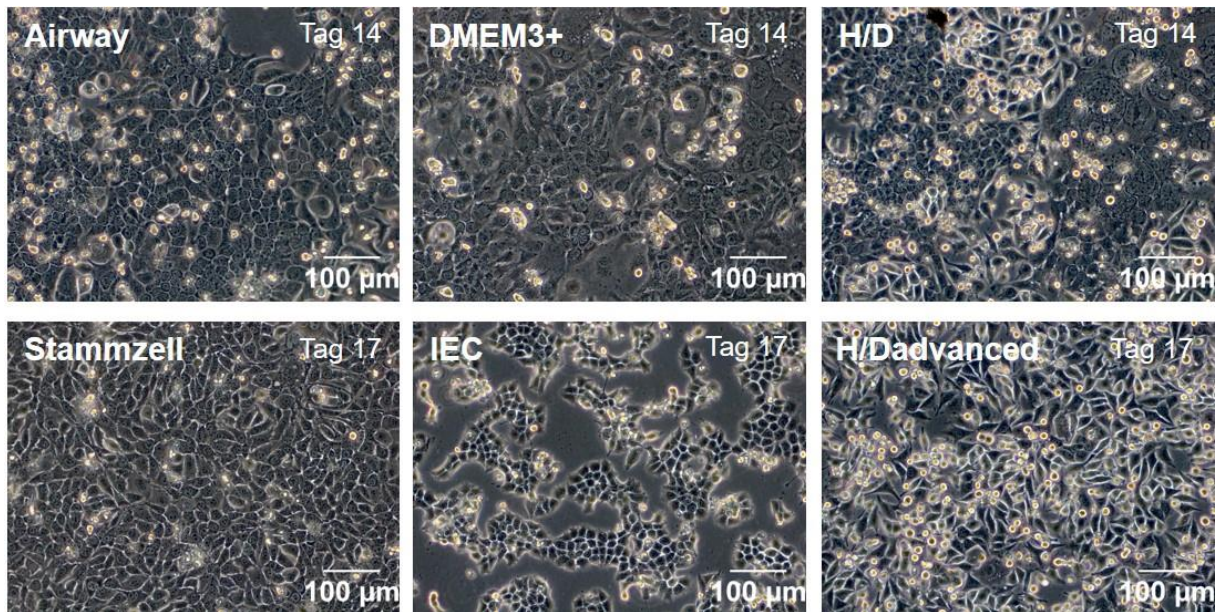


Abbildung 40: Morphologie von I9K6 der Passage 17 in verschiedenen Medien nach 14 Tagen bzw. 17 Tagen Kultivierung.

Die generierten Klone wurden für zwei bis drei Wochen in unterschiedlichen Medien (Airway, DMEM3+, H/D, Stammzell, IEC und H/Dadvanced) kultiviert und lichtmikroskopisch ausgewertet. Exemplarisch ist die Morphologie von I9K6 der Passage 17 in den verschiedenen Medien dargestellt. Die Zellen wurden nach erreichter Konfluenz 1 zu 5 gesplittet und alle zwei bis drei Tage morphologisch untersucht. Dafür wurden Aufnahmen mit dem Mikroskop gemacht.

Tabelle 31 gibt eine Übersicht der Populationsverdopplungen der analysierten Klone nach zwei bis drei Wochen Kultivierung in den verschiedenen Medien. Teilweise stellte sich die Einordnung der verwendeten Medien als schwierig heraus, da einzelne Klone in den Medien unterschiedlich stark proliferierten. In Tabelle 31 sind die berechneten kumulativen Populationsverdopplungen pro Tag zusammengefasst und mit einem Farbschema von schlechter Proliferation bis hin zu guter Proliferation eingeordnet. Eine geringe Populationsverdopplung wird durch rot dargestellt und grün zeigt eine ausreichende Populationsverdopplung an.

Zusammenfassend wurde festgehalten, dass das Stammzell-Medium zunächst nur schwer zu ersetzen war. Dennoch wurde das H/Dadvanced-Medium durch die durchweg mittlere Proliferationsgeschwindigkeit für die weitere Charakterisierung der Klone ausgewählt. Dies stellte die bestmögliche Variante zum Stammzell-Medium laut der analysierten kumulativen Populationsverdopplung pro Tag dar, um die immortalisierten Klone genauer unter spezifischen Kultivierungsbedingungen zu charakterisieren.

3. Ergebnisse

Tabelle 31: Übersicht über die Populationsverdopplung pro Tag einiger Klone bei der Kultivierung nach 2-3 Wochen in verschiedenen Medien

Medium mit erzielter PDL	Airway	DMEM3+	H/D	Stammzell	IEC	H/Dadvanced
I9K4 nach 20 Tagen	0,28	0,51	0,4	0,51	0,51	0,51
I9K6 nach 24 Tagen	0,48	0,67	0,67	0,67	0,48	0,58
I9K8 nach 14 Tagen	0,16	0,33	0,33	0,66	0,16	0,43
I9K9 nach 24 Tagen	0,58	0,38	0,38	0,67	0,58	0,48
I9K10 nach 25 Tagen	0,41	0,32	0,32	0,5	0,32	0,42
I9K11 nach 10 Tagen	0,46	0,46	0,46	0,69	0,46	0,46
I9K13 nach 21 Tagen	0,44	0,44	0,44	0,55	0,44	0,33
I9K15 nach 20 Tagen	0,35	0,46	0,46	0,46	0,35	0,35
I9K17 nach 14 Tagen	0,66	0,49	0,49	0,66	0,33	0,33
I9K19 nach 20 Tagen	0,28	0,28	0,28	0,51	0,4	0,28
I9K21 nach 18 Tagen	0,51	0,51	0,51	0,64	0,51	0,64
I12K2 nach 18 Tagen	0,26	0,26	0,26	0,64	0,26	0,51

Um die Funktionalität der generierten Klone mit dem selbst entwickelten, definierten Medium zu gewährleisten, wurde zunächst die Barrierefunktion mittels TEER-Messung analysiert. Dafür wurden die Klone eine Woche zur optimalen Anpassung an das neue Medium kultiviert. Gleichzeitig wurde auf eine Beschichtung der Kultivierungsgefäße bei Verwendung des H/Dadvanced-Mediums verzichtet, um das System weiter zu vereinfachen. Es wurden 100.000 Zellen pro Transwell ausgesät und über mehrere Wochen kultiviert. Der Widerstand wurde alle zwei Tage gemessen sowie das Medium gewechselt.

I9K6 zeigte einen ähnlichen TEER-Verlauf im Vergleich zum Stammzell-Medium, wobei im selbst entwickelten H/Dadvanced-Medium die Barriere länger auf einem höheren Level konstant war. Auch die beiden Klone K2 und K9 aus der Infektion I12 zeigten kaum einen Unterschied in der Barriere-Ausbildung beim Vergleich des Stammzell-Mediums mit H/Dadvanced. Leichte Unterschiede wurden bei K8 und K11 der Infektion I9 deutlich. Für den Klon K8 konnte keine Barrierefunktion in H/Dadvanced, sowie nur eine Entwicklung des TEERs nach drei Wochen Kultivierung im Stammzell-Medium nachgewiesen werden. I9K11 bildete bei der Kultivierung im H/Dadvanced einen höheren TEER-Wert ($0,8 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) verglichen zur Kultivierung im Stammzell-Medium ($0,4 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) aus. Für I9K10 wurde sowohl im Stammzell-Medium als auch H/Dadvanced-Medium keine Barriere-Entwicklung mittels TEER gemessen. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass nach der Anpassung an das selbst entwickelte H/Dadvanced-Medium die generierten Zelllinien ähnliche Tendenzen zur TEER-Ausbildung zeigten, verglichen mit dem ursprünglich verwendeten Stammzell-Medium. Auch nach 40 Tagen wurde ein TEER noch nachgewiesen, wenn die Zellen

3. Ergebnisse

in H/Dadvanced-Medium mit Zusätzen (Rock, EGF, N-Acetylcystein, B27, N2) kultiviert wurden (Abbildung 41).

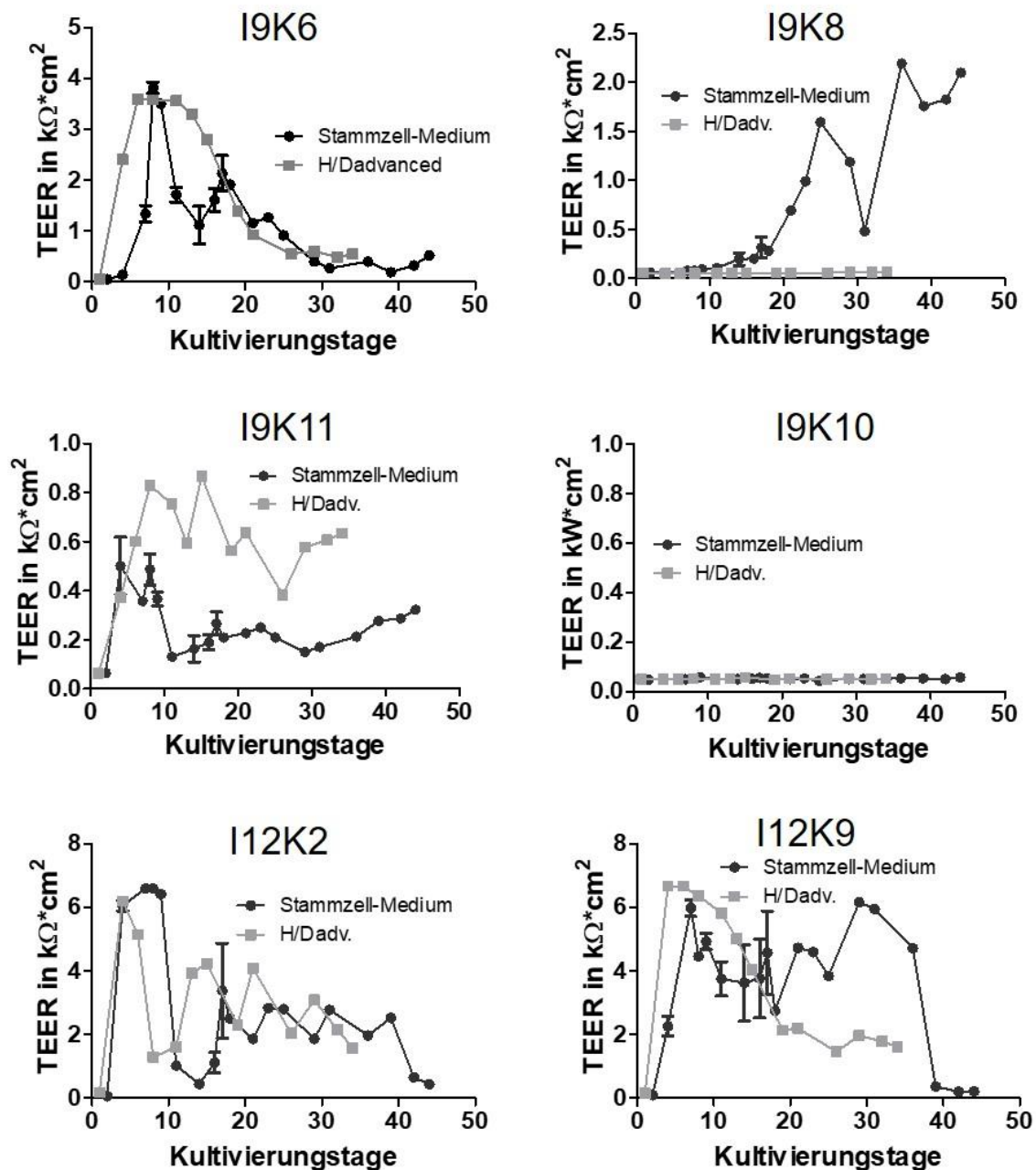


Abbildung 41: Medienvergleich bei der Ausbildung des epithelialen Widerstandes.

Die verschiedenen immortalisierten Zelllinien (I9K6, I9K8, I9K10, I9K11, I12K2 und I12K9) wurden auf Transwells ausgesät (100.000 Zellen) und in den beiden Medien (Stammzell-Medium und H/Dadvanced) für die angezeigte Zeitdauer kultiviert. Für die Kultivierung in H/Dadvanced wurde auf die Beschichtung der Transwells verzichtet, wobei die Zellen in Stammzell-Medium weiterhin auf Kollagen/Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert wurden. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde der Widerstand mittels EVOM Volttohmmeter gemessen.

3. Ergebnisse

Als weiterer funktionaler Nachweis wurde die Sekretion von Mucus untersucht. Hierzu wurden die immortalisierten Zelllinien sowohl im Stammzell-Medium mit Kollagen/Fibronektin-beschichteten Kultivierungsgefäßen als auch im H/Dadvanced-Medium ohne Beschichtung der Zellkulturgefäße kultiviert und mittels der Alcianblau-Färbung analysiert. Dabei konnte nach einigen Wochen Kultivierung in H/Dadvanced-Medium kein Unterschied zur ursprünglichen Mucussekretion festgestellt werden, sodass sich dieses neu entwickelte Medium als geeignete Alternative herausstellte. Dargestellt in Abbildung 42 ist der Vergleich der Schleimproduktion zwei exemplarisch ausgewählter Klone (I9K6 und I9K10) bei der Kultivierung im Stammzell-Medium und der Kultivierung in H/Dadvanced. Die nachweisbare Blaufärbung des Mucus mithilfe von Alcianblau-Lösung sowohl in Stammzell-Medium als auch H/Dadvanced wurde als überlagerte Schicht auf den Zellen dargestellt.

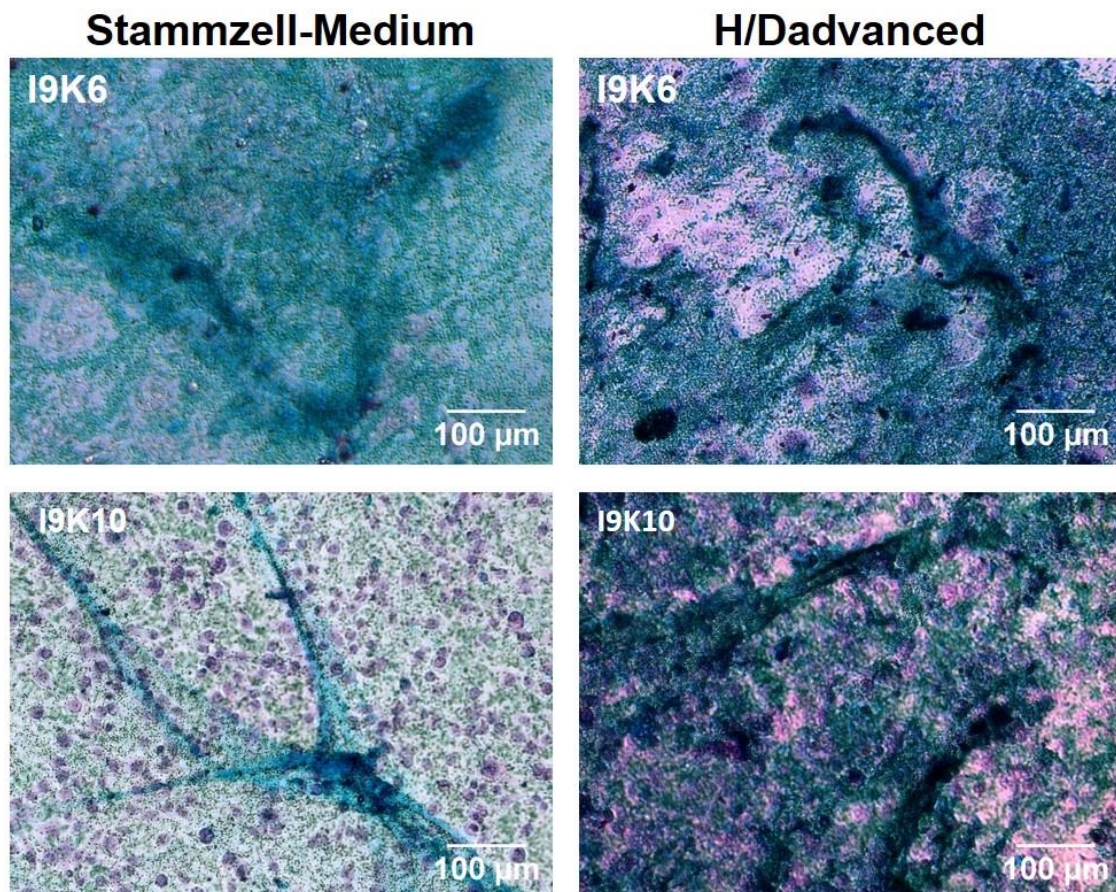


Abbildung 42: Mucussekretion bei der Kultivierung in Stammzell-Medium und H/Dadvanced
Die generierten Zellen (I9K6 und I9K10) wurden für mindestens zwei Wochen im neu entwickelten H/Dadvanced-Medium für die Anpassung an die neuen Bedingungen kultiviert. Es wurde I9K6 der Passage 28 sowie I9K10 der Passage 38 untersucht. Für den Nachweis von Mucus wurden die Zellen für 2-3 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und mit Alcianblau-Lösung die Schleimschicht angefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem Methanol/Aceton fixiert und danach für 2-3 h mit der Färbelösung bei RT gefärbt. Die Auswertung erfolgte über mikroskopische Aufnahmen.

3. Ergebnisse

Zur weiteren funktionalen Analyse und zur Überprüfung, ob die Kultivierung in den unterschiedlichen Medien die Zellen beeinflusst, wurden die Klone erneut in Matrigel zur 3D-Kultivierung ausgesät und die Ausbildung spezieller Organoid-Strukturen beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass trotz Veränderung des Kultivierungsmediums vom Stammzell-Medium hin zum definierten H/Dadvanced die generierten Zelllinien weiterhin in der Lage sind 3D-Organoid auszubilden (Abbildung 43). Nach 7 Tagen 3D-Kultivierung wurden verschiedene Strukturen deutlich. Bei der 3D-Kultivierung im Stammzell-Medium wurde beobachtet, dass einige Klone (I9K6 und I12K9) Organoid-Strukturen nach einer Woche Kultivierung ausbildeten und andere Klone wie beispielsweise I9K10 Zellaggregate zeigten, die nicht die typischen Strukturen darstellten.

Es wurde ersichtlich, dass die Zellen auch nach der Überführung in H/Dadvanced-Medium nach 7 Tagen Kultivierung in Matrigel Sphäroide formten. Klone, die zuvor schon keine Organoid-Bildung im Stammzell-Medium zeigten, waren auch in H/Dadvanced-Medium nicht in der Lage Organoid-Strukturen auszubilden. In Abbildung 43 werden exemplarisch drei Klone gezeigt, wobei I9K6 der Passage 38, I9K10 der Passage 48 und I12K9 der Passage 23 untersucht wurden. Ebenso wie im Stammzell-Medium bildeten beispielsweise I9K6 und I12K9 nach 7 Tagen Kultivierung in Matrigel Primär-ähnliche Organoid aus, wobei andere wie z.B. I9K10 Zellansammlungen, aber keine Organoid-Strukturen in der 3D-Kultivierung ausbildeten. Dabei schienen sich die Zellen von I9K10 zwar deutlich zu vermehren, aber nur Zellaggregate zu bilden, die auf keine geordnete Struktur hinwiesen. Außerdem zeigte I12K9 in H/Dadvanced-Medium sogar Ausstülpungen aus dem Rand des Organoids, was auf die weitere Differenzierung der Zellen hindeutete. H/Dadvanced ersetzte somit das teure Stammzell-Medium und war optimal für die Kultivierung der Zellen geeignet.

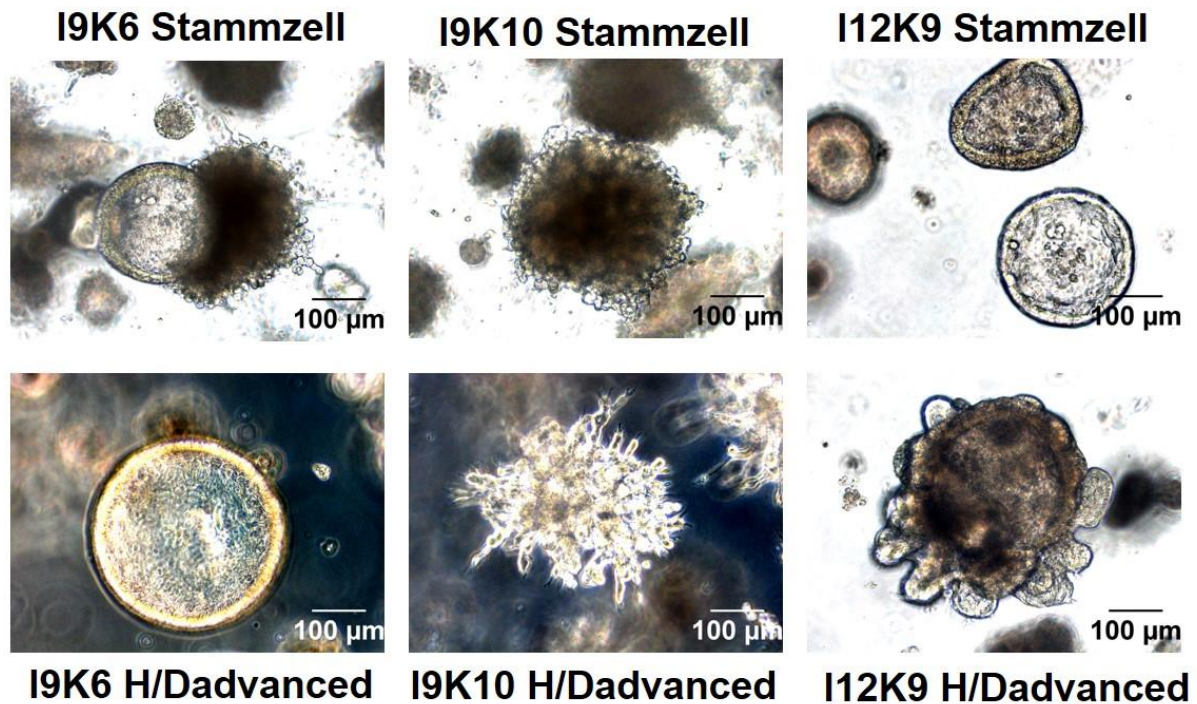


Abbildung 43: 3D-Strukturen in H/Dadvanced (untere Reihe) im Vergleich zum Stammzell-Medium (obere Reihe) für 3 Klone nach 7 Tagen Kultivierung in Matrigel.

Die immortalisierten Zellen wurden zuvor für mehrere Wochen in den zwei verschiedenen Medien (H/Dadvanced und Stammzell-Medium) kultiviert, um eine Anpassung an die Medienbedingungen zu gewährleisten. Es wurden 20.000 Zellen der drei generierten Zelllinien I9K6 der Passage 38, I9K10 der Passage 48 und I12K9 der Passage 23 in Matrigel für die 3D-Kultivierung ausgesät. Zur Analyse wurden nach 7 Tagen mikroskopische Bilder aufgenommen, um die Entwicklung der 3D-Organoiden zu verdeutlichen.

Nachdem aus der 3D-Kultivierung hervorging, dass einige der generierten Zelllinien (I9K6, I9K8, I12K2, I12K9) 3D-Strukturen ausbildeten, wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR auf Zelltyp-spezifische Marker analysiert. Der Vergleich erfolgte mit den murinen primären Kryptenkulturen, um eine Einordnung der Expressionshöhen verschiedener Marker zu ermöglichen. Es wurden Marker für die sekretorischen Zellen wie Atoh1 sowie Mucin2 typisch für Becherzellen, Lysozym charakteristisch für Panethzellen und ChromograninA für enteroendokrine Zellen untersucht. Weiterhin wurde der Stammzellmarker Lgr5 und Villin1 als oberflächenvergrößerndes Protein mittels qRT-PCR analysiert. Verglichen mit den primären Kryptenzellen zeigten die immortalisierten Zelllinien deutlich geringere Expressionen der analysierten Marker (Abbildung 44). Außerdem wurde deutlich, dass die einzelnen Klone sich untereinander kaum in der Markerexpression unterschieden.

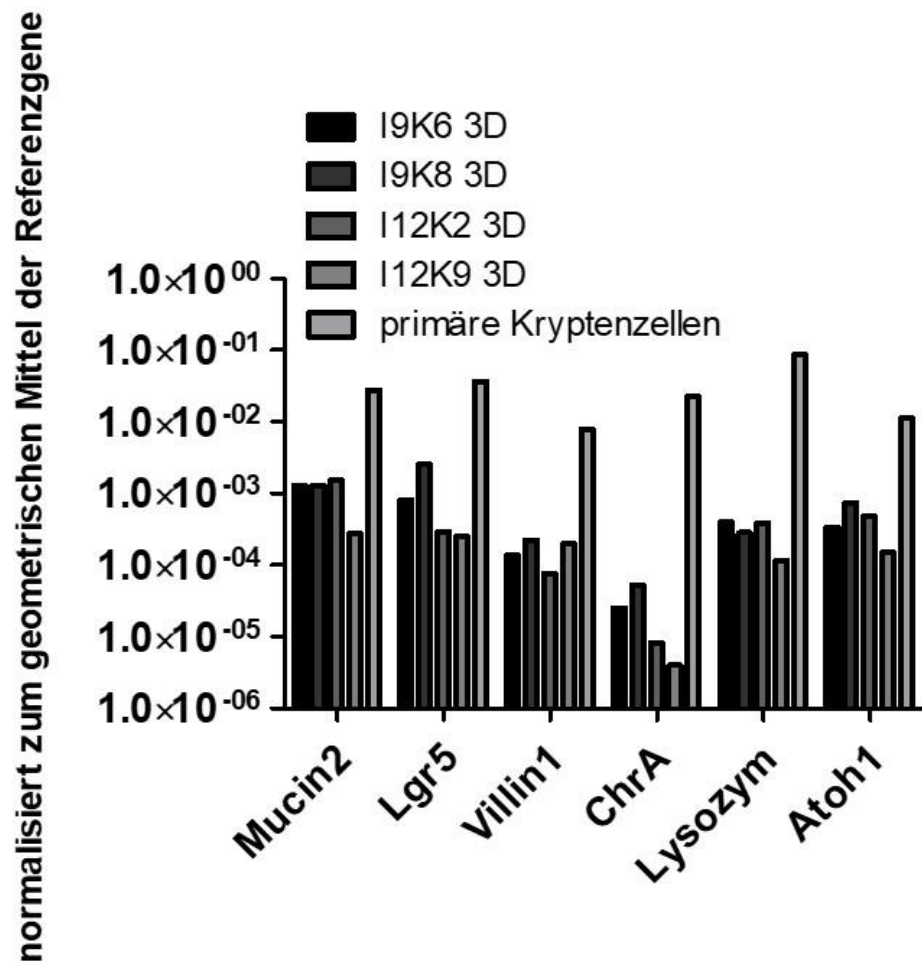


Abbildung 44: Vergleich der Markerexpression von dreidimensional kultivierten Klonen in H/Dadvanced-Medium

Die generierten Zelllinien I9K6, I9K8, I12K2 und I12K9 wurden aus der 3D-Kultivierung im Matrigel mit H/Dadvanced-Medium herausgelöst und die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde verwendet, um die Zelltyp-spezifischen Marker zu analysieren. Es wurde Mucin2 typisch für Becherzellen, Lgr5 spezifisch für Stammzellen, Villin1 für Enterozyten, ChromograninA für enteroendokrine Zellen, Lysozym typisch für Panethzellen und Atoh1 charakteristisch für sekretorische Zellen untersucht. Als Referenz wurden die murinen intestinalen Krypten verwendet.

3.8 Einfluss der Kultivierungsstrategie auf die Marker-Expression

Neben der Analyse verschiedener Medien zur Kultivierung der generierten Zelllinien, wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen wie beispielsweise die 2D-Kultivierung, Kultivierung im Transwellsystem und 3D-Kultivierung im Matrigel für einige Zelltyp-spezifische Marker betrachtet. Somit wurde die Abhängigkeit der RNA-Expression bestimmter Marker von der Kultivierungsart analysiert.

Bei der 2D-Kultivierung hatten die Zellen keine gerichtete Anordnung, wohingegen im Transwellsystem die Zellen apikal und basolateral ausgerichtet waren. Somit sollte eine verstärkte Expression bestimmter Marker gefördert werden. Diese Steigerung war weiterhin möglich, sobald die Zellen im komplexen Matrigel zur 3D-Kultivierung analysiert wurden. Dabei bildeten die Zellen Organoide und Primär-ähnliche Strukturen aus, sodass von einer maximalen Differenzierung vergleichbar zu den murinen intestinalen Organoidkulturen ausgegangen wurde.

Die Klone wurden 1-2 Wochen unter den verschiedenen Bedingungen im Stammzell-Medium kultiviert. Es wurden Zell-typische Marker wie z.B. Lysozym für Panethzellen und Lgr5 für Stammzellen sowie der Enterozyten-Marker Villin1 untersucht (Abbildung 45). Die Ergebnisse wurden zum *Houskeeping*-Gen Rpl15 normalisiert. Es wurden exemplarisch zwei Klone (I9K8 und I12K7) zur genaueren Analyse herangezogen. Es wurde deutlich, dass mittels 2D-Kultivierung nur eine sehr geringe Expression der Marker erreicht wurde. Mit Änderung der Kultivierungsbedingung im Transwellsystem wurde die Expression bestimmter Marker verbessert, da die Zellen somit in der Lage waren, sich apikal und basolateral auszurichten. Damit wurde eine gerichtete Anordnung der Zellen ermöglicht. Sobald die Zellen in der komplexen 3D-Umgebung im Matrigel wuchsen, wurde eine Steigerung der Expression von Lysozym, Lgr5 und Villin1 vergleichbar zu den murinen intestinalen Kryptenkulturen erreicht. Für beide analysierten Klone I9K8 und I12K7 wurde eine Steigerung ermittelt.

Die Expression für Lysozym und Lgr5 wurde unabhängig vom Klon um jeweils eine Log-Stufe gesteigert, sobald die Zellen von der 2D-Kultivierung in das Transwellsystem und weiterhin in 3D-Kultivierung mittels Matrigel überführt und 1-2 Wochen kultiviert wurden. Für die Expression des Enterozytenmarkers Villin1 wurde nur eine starke Expressionszunahme bei 2D-Kultivierung zum Transwellsystem ermittelt, wobei eine weitere Steigerung der Expression durch die Matrigel-Kultivierung nicht nachgewiesen wurde. Dies ließ vermuten, dass eine Ausrichtung in apikaler und basolateraler Seite ausreicht, um die Villin1-Expression zu verstärken. Weiterhin

3. Ergebnisse

befand sich die Expressionshöhe von Villin verglichen mit den murinen intestinalen Kryptenkulturen ca. 1,5 Log-Stufen geringer als bei den analysierten Klonen. Zwar erfolgte eine Steigerung der Expression von Lysozym und Lgr5 durch die Überführung von 2D-Kultivierung in die 3D-Kultivierung, jedoch lag die Expression weiterhin eine Log-Stufe unterhalb der murinen intestinalen Kryptenkulturen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass unabhängig von der generierten Zelllinie die Expression bestimmter Marker durch die Anpassung bzw. Veränderung der Kultivierungsbedingung gesteigert wurde. Bei 2D-Kultivierung war die Lysozym- und Lgr5-Expression um drei Log-Stufen niedriger gegenüber der murinen intestinalen Kryptenkultur. Die Expression wurde dann um zwei Log-Stufen gesteigert, sobald die Zellen in Matrigel ausgesät wurden.

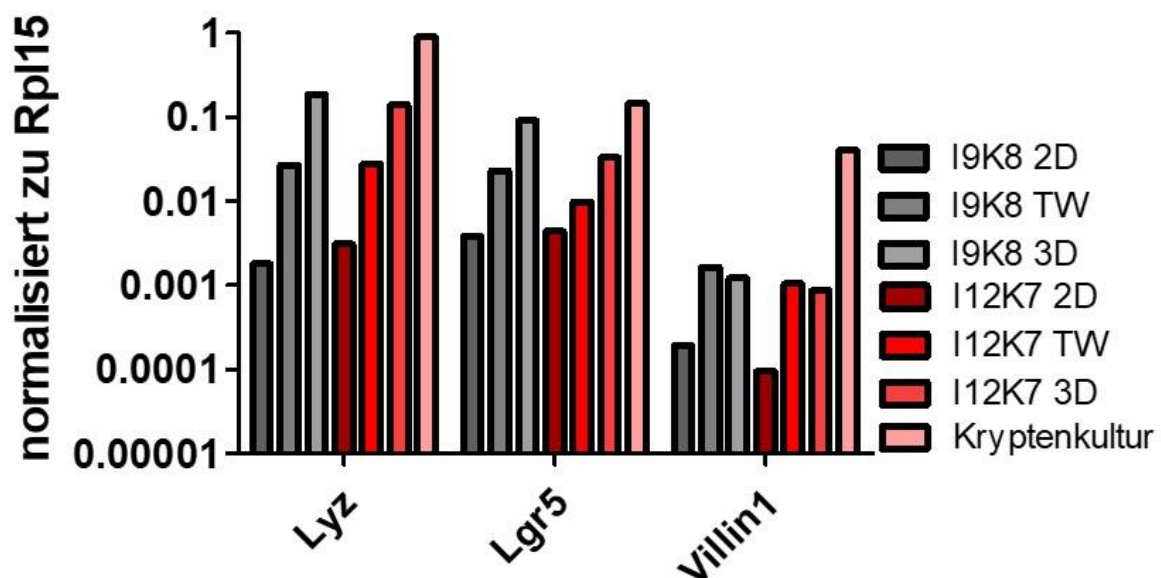


Abbildung 45: Vergleich der Markerexpression spezifisch für Panethzellen (Lysozym), Stammzellen (Lgr5) und Enterozyten (Villin1) bei verschiedenen Kultivierungsstrategien

Die generierten Klone I9K8 und I12K7 wurden in 2D-Kultivierung im konfluenten Zustand geerntet und analysiert. Für die Kultivierung der Zellen im Transwellsystem wurden die Klone für zwei Wochen im Stammzell-Medium unter Beobachtung der Barrierefunktion kultiviert. Für die 3D-Kultivierung wurden die Zellen in Matrigel unter Ausbildung der Organoid-Strukturen für 1-2 Wochen kultiviert. Die Zellen wurden mittels Trifast geerntet und die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde für die Analyse der quantitativen Markerexpression von Lysozym, Lgr5 und Villin1 mittels qRT-PCR verwendet.

3.9 Anwendungen der generierten Darmepithelzelllinien

3.9.1 EPEC-Infektion

Um die Zellen optimal anzuwenden, war die Durchführung von Infektionsanalysen essentiell. Im Darm tritt durch die Nahrungsaufnahme ein ständiger Kontakt mit potentiellen Erregern auf. Deshalb kann eine Infektion mit z.B. *E. coli* oder Salmonellen erfolgen. EPEC als enteropathogenes *E. coli* verursacht Diarrhoe besonders bei Kleinkindern und Neugeborenen. Dieses gramnegative Bakterium wird direkt oder indirekt über mit Exkrementen verunreinigte Lebensmittel oder Trinkwasser aufgenommen. EPEC adhäriert an die Darmzellen des Dünndarms und nimmt durch sein TypIII-Sekretionssystem und bestimmte Filamente (EspA) den ersten Kontakt zu den Darmepithelzellen auf. Dabei werden besonders Enterozyten infiziert und die EPEC-Erreger in die Zelle eingebracht. Außerdem wird das Protein *bundle-forming-pilus* (BFP) exprimiert und das Adhäsin Intimin. Diese Anheftung des Intimins von EPEC an die Zielzelle, zerstört die Mikrovilli auf der Oberfläche. Außerdem werden Toxine ausgeschüttet wie Enterohämolysin, die den Zellstoffwechsel beeinflussen, indem die Zellen aktiv Wasser und Ionen ausscheiden und somit permeabel werden. Dies führt zur Darmentzündung und Zellen sterben ab. Auf Zellkulturebene wurde festgestellt, dass die Infektion mit EPEC Anheftungsstörungen der Darmepithelzellen auslöst sowie Veränderungen im Ionentransport, eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität und auch Entzündungen werden angeregt.

Für die Charakterisierung der generierten Darmepithelzellen wurden die Zellen mittels EPEC-Infektion auf ihre Funktionalität untersucht. Dafür wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sabrina Mühlen die Infektion mit EPEC durchgeführt. Charakteristisch für die Infektion mit EPEC ist die Zerstörung von Zell-Zell-Kontakten und somit die Erhöhung der parazellulären Permeabilität. Diese wurde mittels TEER-Messgerät über die Messung des epithelialen Widerstandes verfolgt und analysiert. Um herauszufinden, ob sich die neu generierten Klone ähnlich zu anderen Darmepithelzellen wie beispielsweise den humanen Caco2-Zellen verhielten, wurden diese mit dem EPEC-Wildtyp-Stamm E2348/69 sowie zur Kontrolle mit der EPEC-Mutante E69ΔescN infiziert. Die EPEC-Mutante wies eine Mutation im TypIII-Sekretionssystem auf. Das bedeutet, dass diese Mutante nicht in der Lage war *tight junctions* also Zell-Zell-Kontakte aufzulösen und Barrieren zu zerstören. Für die Durchführung der EPEC-Infektion wurden die Zellen (I12K2 und I12K9) zuvor für eine Woche auf Transwells ausgesät, um eine maximal dichte Barriere zu erhalten. Diese wurde im nächsten

3. Ergebnisse

Schritt durch Infektion mit dem EPEC-Wildtyp E2348/69 zerstört und durch die Abnahme des epithelialen Widerstandes über die Messung des TEER-Wertes nachverfolgt. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob EPEC mithilfe des TypIII-Sekretionssystems das *tight junction* Protein ZO-1 zerstören kann, wurde gleichzeitig die Infektion mit der EPEC-Mutante E69 Δ escN, die kein funktionales TypIII-Sekretionssystem besitzt, durchgeführt. Die immortalisierten Darmzellen wurden mit 50 Mio *E. coli*-Zellen infiziert. Es wurden zwei verschiedene Klone der Infektion I12 (K2 und K9) analysiert und die Abnahme des TEER über die Zeit gemessen (Abbildung 46). Dabei wurde sowohl bei I12K2 als auch I12K9 nach 4-6 h eine Abnahme des epithelialen Widerstandes ermittelt.

Zusätzlich zur Barriermessung wurden im Anschluss an das Experiment die Zell-Zell-Kontakte analysiert. Hierzu wurden die Zellen der verschiedenen Experimente fixiert und mittels Immunfluoreszenz auf die Expression/Lokalisation von ZO-1 untersucht. Für die uninfizierten Zellen und die mit der EPEC-Mutante E69 Δ escN infizierten Zellen wurde eine gleichmäßige Anfärbung bzw. Expression von ZO-1 nachgewiesen. Die Analyse der Proteinexpression des *tight junction* Proteins ZO-1 stimmte mit den gemessenen TEER-Werten der uninfizierten Zellen und EPEC-Mutante E69 Δ escN-infizierten Zellen überein, die nur leichte Schwankungen im Widerstand zeigten, aber keine eindeutige Abnahme. Im Gegensatz dazu wurden nach der Infektion mit dem EPEC-Wildtyp E2348/69 nur noch Reste des Proteins ZO-1 mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt. Dies passte auch mit den gemessenen epithelialen Widerständen nach der Infektion mit dem EPEC-Wildtyp E2348/69-Stamm zusammen, die eine starke Abnahme in der Barriere zeigten. Der Vergleich zwischen den immortalisierten Zelllinien ergab eine stärkere Abnahme der Barrierefunktion bei I12K9, wobei aus der Analyse der Proteinexpression des *tight junction* Proteins ZO-1 keine signifikanten Unterschiede deutlich wurden. Außerdem wurde für die Zelllinie I12K2 zu Beginn ein geringerer TEER-Wert gemessen verglichen zu I12K9, sodass I12K9 eine dichtere Barriere aufwies als I12K2 zum Anfang des Infektionsversuches mit EPEC.

3. Ergebnisse

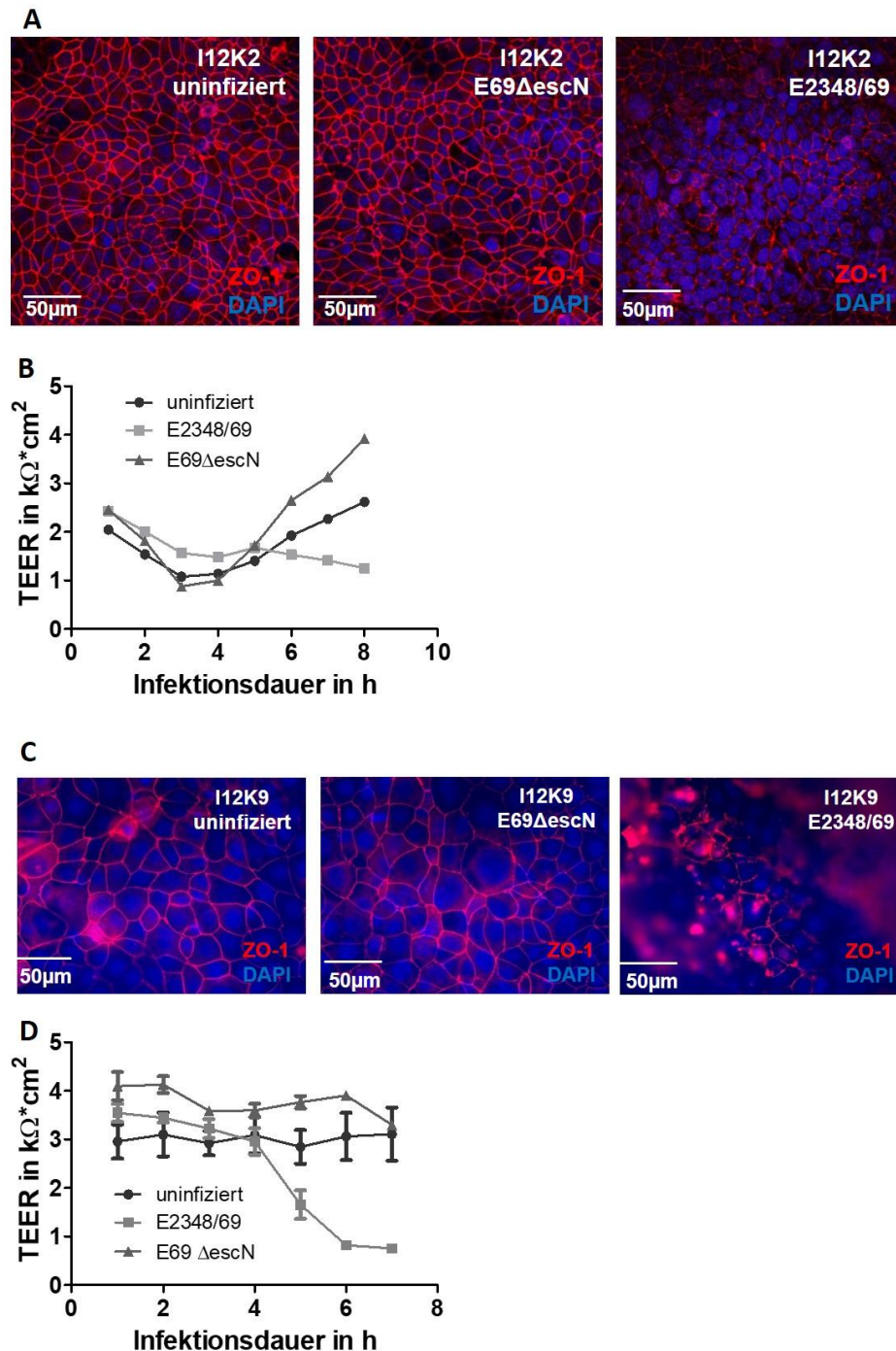


Abbildung 46: Infektionsstudie mit EPEC zur Auflösung der Barriere mit zwei verschiedenen Klonen.

Die Zellen wurden für eine Woche auf Transwells ausgesät und TEER-Werte regelmäßig aufgenommen. Sobald sich eine Barriere ausgebildet hatte, wurde versucht diese über das TypIII Sekretionssystem der EPEC-Zellen zu zerstören. **(B, D)** Dafür wurden 50 Mio *E. coli* Zellen zur Infektion auf die Zellen gegeben und über mehrere Stunden die Veränderung des TEER-Wertes und somit die Abnahme der Barriere analysiert. **(A, C)** Am Ende des Versuches wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und auf das *tight junction* Protein ZO-1 angefärbt. Dafür wurden die Klone für eine Stunde mit dem spezifischen ZO-1-Antikörper inkubiert. Danach erfolgte eine weitere einstündige Inkubation mit einem Cy3-markierten Sekundärantikörper. Die Proben wurden mit DAPI eingedeckelt und über Nacht getrocknet. Danach erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der Infektionsversuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sabrina Mühlen durchgeführt.

4. Diskussion

4.1 2D- vs. 3D-Kultivierung zur Medikamentenentwicklung

Für die Medikamentenentwicklung werden zurzeit noch vereinfachte *in vitro* Testsysteme verwendet, die die wirkliche *in vivo* Pathologie nicht widerspiegeln können. Dafür werden zweidimensional kultivierte Zelllinien verwendet, wobei wichtige Teile für die Biologie der Medikamentenwechselwirkung fehlen. Die identifizierten Ausgangsverbindungen werden nach bestimmten Treffern ausgewählt, die nur ganz spezifische molekulare Angriffspunkte oder phänotypische Aspekte betreffen. Die bisherigen Modelle sind zu sehr vereinfacht und können die komplexen Vorgänge für die Medikamententestung nicht darstellen.

Auch die kostenintensiven Tiermodelle stellen keine ausreichende Lösung des Problems bereit, da auch zwischen Tieren und dem Menschen zu viele Unterschiede existieren. Außerdem sollten Tierversuche möglichst vermieden werden (Russell et al. 1959), wobei *in vitro* Modelle die bisher bestmögliche Alternative darstellen. Diese Problematik führte die Organoid-Technologie besonders in der Krebsforschung voran (LaBarbera et al. 2012, Kunz-Schughart et al. 2004). Unter der Organoid-Technologie wird die Kultivierung von Primärzellen aus verschiedenen Geweben in einer komplexen 3D-Umgebung verstanden. Einerseits können die Organoide direkt aus Gewebeproben in Kultur genommen oder aus induzierbaren pluripotenten Stammzellen bzw. embryonalen Stammzellen in Organoide differenziert werden. Dabei wird den Stammzellen ermöglicht in die verschiedenen Zelltypen des Gewebes wie beispielsweise des Dünndarms (Panethzellen, enteroendokrine Zellen, Gobletzellen und Enterozyten) zu differenzieren und somit die komplexe Krypten-Struktur darzustellen. Mithilfe dieser 3D-Organoide war es erstmals möglich die Schlüsselsignalwege für die Erhaltung von multizellulären Organen aufzuklären. Über die Organoid-Kultivierung können Sauerstoff- und Proliferationsgradienten erzeugt werden, die über eine 2D-Kultivierung nicht möglich sind. Trotzdem bringt die 3D-Kultivierung in Matrigel auch Nachteile mit sich, die die Medikamenten-Forschung erschweren.

Für die Medikamenten-Entwicklung werden reproduzierbare, gut definierte und skalierbare 3D-Systeme benötigt. Zuvor wurden Stammzellen auf Feederschichten aus Fibroblasten kultiviert, wobei die Feederzellen eine ECM produzieren und somit das Stammzellwachstum unterstützen (Jensen et al. 2010). ECM-basierte Hydrogele

wie Matrigel fördern die 3D-Aggregation und Polarisation von (Stamm)-Zellen (Montesano et al. 1991, Xu et al. 2001). Matrigel wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom (EHS-Sarkom) der Maus gewonnen und dieser ist eine gute Quelle für einzelne Basalmembrankomponenten und Matrigel (Kleinman et al. 1986, Orkin et al. 1977). Das EHS-Sarkom wird aus den Mäusen isoliert und in C57BL6N-Mäusen gespritzt. Danach werden diese bösartigen Tumore nach Erreichen einer optimalen Größe erneut aus den C57BL6N-Mäusen isoliert und sofort in Stickstoff eingefroren. Zur Matrigel-Aufarbeitung werden die Tumore aufgetaut und homogenisiert. Nach erfolgter Dialyse bei 4 °C muss das isolierte Matrigel kühl gelagert werden, da sonst eine Polymerisation stattfindet (Kibbey 1994).

Diese ECM besteht hauptsächlich aus Laminin-1, welches eine extrazelluläre Verbindung der Basalmembran ist. Außerdem sind noch eine Mischung aus KollagenIV und Nidogen-1 sowie Heparinsulfat-Proteoglycane als Bestandteile bekannt (Kleinman et al. 1982, Kleinman & Martin 2005). Zudem sind Wachstumsfaktoren in variierenden Konzentrationen wie z.B. TGF β , EGF, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), der gewebspezifische Plasminogenaktivator (tPA) sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) im Matrigel zu finden (Vukicevic et al. 1992).

Diese relativ inkonstante Zusammensetzung und nicht quantifizierbare Chargenvariation aufgrund der bereits erwähnten Gewinnung des Matrigels macht die Anwendung für die möglichst reproduzierbaren und im großen Maßstab durchführbaren Tests unmöglich. Außerdem gibt es weitere Limitierungen bei der Handhabung, da Matrigel immer kühl gehalten werden muss, was in der Roboter-Technologie nicht möglich ist. Aus diesem Grund gibt es Bestrebungen dieses ECM-Gemisch durch definierte Bestandteile zu ersetzen.

Dafür wurden synthetische Biomaterialien untersucht, wie z.B. Nanofibrillen, durch Selbstorganisation geformte supramolekulare Materialien und Matrizes, die biochemische ECM-abgeleitete Signale präsentieren (Lutolf & Hubbell 2005). Diese stellen auch für das neu generierte *in vitro* System eine Möglichkeit zur Kultivierung dar.

4.2 Charakterisierung der Enterozyten (Mrp1, ZO-1, Ecadherin, TEER) im Vergleich zu Caco-2

Enterozyten zeichnen sich durch die Ausbildung enger Zell-Zell-Kontakte aus, die durch *tight junction* Proteine zwischen den Zellen entstehen. Damit wird die Permeabilität gegenüber Ionen, Makromolekülen und Zellen mittels parazellulären Wegs reguliert. *Tight junctions* bilden verschiedene Arten von Barrieren, zum einen die erste Barriere zwischen apikaler und basolateraler Membran und zum anderen die zweite Barriere zwischen apikaler und basolateraler Seite als auch den parazellulären Weg, um Wasser, Stoffe und Zellen von außen nach innen und andersherum transportieren zu können (Assimakopoulos et al. 2011).

Für die Medikamentenentwicklung spielt auch der gerichtete Transport eine wichtige Rolle. Beispielsweise ist das humane Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) wichtig für den Transport bzw. das Ausschleusen von endogenen Substanzen wie Leukotrienen und Estrogen-Konjugaten sowie Xenobiotika und deren Metabolite wie Anti-Krebs-Medikamente, Schwermetalle, organische Anionen und Lipide (He et al. 2011). Zellen, die MRP1/ABCC stark exprimieren, zeigen eine Resistenz gegenüber Anti-Krebs-Medikamenten, sodass es zur Tumor-Resistenz kommt. Diese wird über einen erhöhten Ausfluss und verringerte intrazelluläre Ansammlung von natürlichen Anti-Krebs-Agenzien vermittelt. Aus diesem Grund stellt dieser Transporter eine wichtige Angriffsfläche als potentiell Ziel für therapeutische Zwecke in der Chemotherapie dar (He et al. 2011). Für die in dieser Arbeit generierten Zelllinien wurde für einige Klone (I9K9, I9K11, I12K2 und I12K7) die Expression des Mrp1 Transporters mittels PCR nachgewiesen. Somit könnten diese Zelllinien für die Medikamentenentwicklung interessant sein und neue Werkzeuge darstellen, um neue Anti-Krebs-Medikamente zu erforschen.

Außerdem spielt das P-Glykoprotein (P-gp) als ABC-Transporter mit einer ATP-bindenden Kassette bei der Bioverfügbarkeit und Toxizität von Medikamenten eine wichtige Rolle. Diese ABC-Transporter verhindern eine Ansammlung von toxischen Stoffen wie z.B. xenotoxischer Verbindungen. Die Expression in verschiedenen Barriere-bildenden Zellen (Dünndarm, Blut-Hirn-Schranke) beeinflusst die Eigenschaften von Medikamenten und potentiellen Wirkstoffen bei der Pharmakokinetik (ADME) (Laquintana et al. 2009, Demeule et al. 2002). Auch verschiedene Krankheiten wie beispielsweise CF (Gadsby et al. 2006), das Dubin-Johnson Syndrom

(Machida et al. 2005) und auch Alzheimer (Abuznait & Kaddoumi 2012) werden von verschiedenen Transportern beeinflusst.

Für die Untersuchung der Barrierefunktion, werden 4 verschiedene Gruppen integraler *tight junctions* unterschieden: Occludin (Ocln), Claudine (Cldn), junctionales Adhäsionsmolekül und Tricellulin (Assimakopoulos et al. 2011). Dabei setzt sich der parazelluläre, apikale Bereich aus den Proteinen Occludin (Anderson & Itallie 1995), Claudin (Tsukita & Furuse 1999) und ZO-1, ZO-2 und ZO-3 zusammen, die mit dem Aktin-Zytoskelett wechselwirken und das Ende der apikalen Zellseite stabilisieren (Wittchen et al. 1999). Claudine bilden transmembrane und transzelluläre Netze, die der parazellulären Permeabilität, dem transepithelialen Widerstand (Heiskala et al. 2001, Gonzalez-Mariscal et al. 2003, Fanning et al. 1999) sowie der selektiven Durchdringung geladener Moleküle und Ionen dienen (Colegio et al. 2002, Van Itallie et al. 2001).

Davon wurden in dieser Arbeit Occludine und Claudine zunächst näher in den murinen intestinalen Krypten untersucht. Dabei wurde mittels PCR-Analyse Occludin nachgewiesen. Für die Analyse der in dieser Arbeit neu generierten Zelllinien (I12K2, I9K17, I9K6, I9K8, I9K11, I12K9) wurde eine Immunfärbung auf die Expression von ZO-1 durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zum einen in 2D-Kultivierung und im Transwellsystem untersucht. ZO-1 interagiert unter anderem mit Occludin, Claudinen, und dem Aktin-Zytoskelett (Fanning et al. 1998; Itoh et al. 1999), um verschiedene Komponenten zusammen zu bringen und auch *tight junction* Proteine mit dem Zytoskelett zu verbinden. Occludin assoziiert mit ZO-1 wird als linearer Streifen entlang des intestinalen Epithels nachgewiesen und hängt stark vom Differenzierungsstatus der Zellen ab (Kimura et al. 1997).

Die Expression des *tight junction* Proteins ZO-1 und die Ausbildung einer dichten Barriere im Transwellsystem zeigen eine starke Korrelation, da z.B. I9K17 teilweise eine ZO-1-Expression mittels Immunfärbung zeigt und gleichzeitig einen mittleren TEER ($1-2 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) ausbildet. Auch andere Klone bestätigen diesen Zusammenhang, da beispielsweise I12K2 eine sehr dichte Barriere über den TEER zeigt ($6 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) und ein einheitliches Signal bei der ZO-1 Expression in der Immunfärbung. Besonders hervorzuheben ist, dass dieser Zellklon eine dichte Barriere deutlich schneller ausbildet (3-4 Tage) als es für die in der Literatur beschriebenen Zellsysteme zutrifft (z.B. Caco-2 ca. 21 Tage) (Hilgendorf et al. 2000).

EPEC ist ein humanes Darmpathogen, welches an der Oberfläche von intestinalen Epithelzellen bindet und wässrigen Diarrhö auslöst (Moon et al. 1983). Die erste Kontaktaufnahme von EPEC erfolgt über das Plasmid-codierte Protein, *bundle forming pilus* (BFP). Nachdem EPEC an die Zellen gebunden hat, zerstört es die Mikrovilli und bildet charakteristische „*attaching and effacing*“ Läsionen (A/E) aus (Frankel et al. 1998). Unterhalb der *E. coli* formen sich Pedestal-ähnliche Strukturen, die reich an filamentösem Aktin sind (Moon et al. 1983). Virulenzgene des EPEC sind auf einer Pathogenitätsinsel namens *Locus of enterocyte effacement* (LEE) codiert. Dieser LEE codiert für das TypIII-Sekretionssystem, sekretierte Proteine, Chaperone und Intimin (Elliott et al. 1998). Eines dieser Proteine namens EspA bildet hohle Filamente, die die Übertragung von Effektormolekülen von EPEC direkt in die Wirtszelle ermöglichen (Kenny et al. 1996, Knutton et al. 1998). Ein Effektor namens *translocated intimin* Rezeptor (Tir) wird in die Plasmamembran des Wirts eingebracht, wo dieser dann als Rezeptor für das Intimin von EPEC dient (Kenny & Finlay 1997, Rosenshine et al. 1996). Die LEE-codierten Proteine wie z.B. EspF, EspG und EspH stellen Effektorproteine dar, die in die Wirtszelle übertragen werden und somit die Pathogenese auslösen (Crane et al. 2001, Elliott et al. 2001, Kenny & Jepson 2000, McNamara et al. 2001, Tu et al. 2003).

Durch die Infektion mit EPEC werden physiologische Veränderung des intestinalen Epithels ausgelöst. Dazu gehört unter anderem die Veränderung vom Ionentransport (Hecht et al. 2004, Hecht et al. 1999), eine erhöhte parazelluläre Permeabilität (Spitz et al. 1995) und die Auslösung von Entzündungsreaktionen (Savkovic et al. 1997, Savkovic et al. 1996) (Abbildung 47).

In einer Studie von Savkovic et al. 2005 zur Infektion mit EPEC wurde das Bakterium in C57BL/6J-Mäuse eingebracht, um die Veränderungen der Physiologie genauer zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, dass die Mikrovilli aufgelöst und Veränderungen im Aktin auftraten. Weiterhin wurden charakteristische A/E Läsionen in den infizierten Mäusen beobachtet (Savkovic et al. 2005). Die in dieser Arbeit generierten Darmepithelzellen können diese Tierversuche umgehen und zur Analyse der Pathogenese nach EPEC-Infektion genutzt werden.

Für die Infektionsanalyse in dieser Arbeit wurde der Wildtypstamm EPEC O127:H6 verwendet. Als Negativkontrolle wurde der ICC187-Stamm (Δ escN) genutzt, der im TypIII-Sekretionssystem mutiert ist. Das bedeutet, dass diese Mutante nicht in der Lage ist bestimmte Proteine wie beispielsweise N-WASP, welches den Arp2/3-

Komplex aktiviert und somit zur Bildung von Aktinfilamenten führt, zu rekrutieren. Die ΔescN -Mutante produziert kein EspA, wodurch keine Effektorproteine in die Wirtszelle übertragen werden und die Pathogenese ausgelöst wird (Garmendia et al. 2004). Zur Zerstörung der ausgebildeten Barriere kommt es, indem das Occludin dann zytoplasmatisch lokalisiert ist (McNamara et al. 2001). Occludin bindet ZO-1 und ist für die Ausbildung von *tight junctions* notwendig (Simonovic et al. 2000).

Es gibt ein endogenes Protein, welches in der Lage ist *tight junctions* der Epithelzellen selbst zu regulieren. Dieses Protein namens Zonulin induziert den Abbau von *tight junctions*. Außerdem können diese Proteine durch Zytokin-Expression und Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts über andere bakterielle Mechanismen wie z.B. Intimin-Tir-Mechanismen des enteropathogenen *E. coli*s beeinflusst werden (Wang et al. 2000).

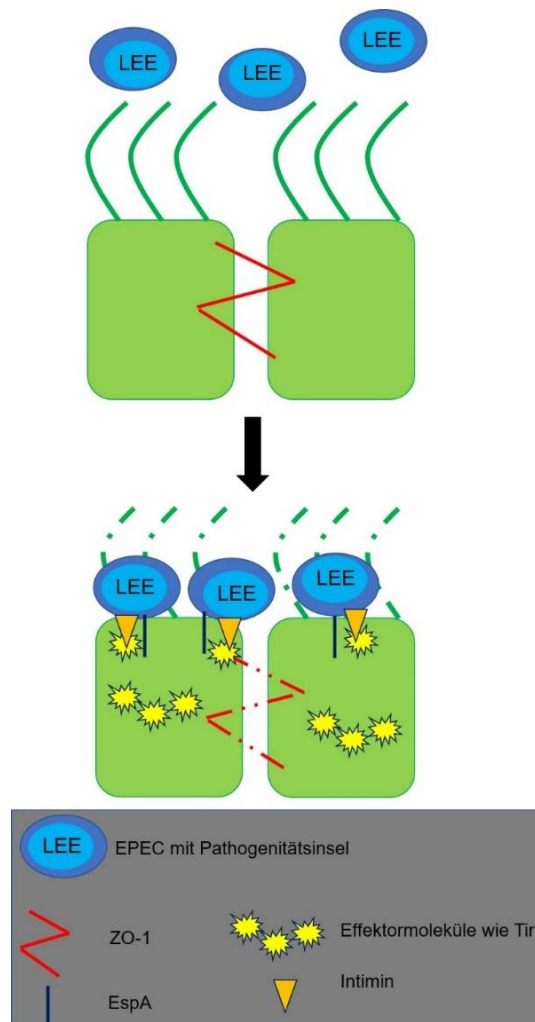


Abbildung 47: Darstellung der EPEC-Infektion mit Auflösung der Barrierefunktion

EPEC enthält Pathogenitätsinseln, die Effektormoleküle mittels EspA über das TypIII-Sekretionssystem in die Epithelzelle einbringen. Diese Effektormoleküle wie Tir dienen der Bindung von Intimin des *E. coli*s an die Wirtszelle. Somit wird das *tight junction* Protein ZO-1 zerstört und auch Mikrovilli auf der Zelloberfläche der Darmepithelzellen.

Die exemplarisch durchgeführten Untersuchungen mit EPEC demonstrierten, dass die generierten Zelllinien sich für die Analysen von Pathogenitätsmechanismen eignen. Durch die Ausbildung einer dichten Zell-Zell-Barriere können somit grundlegende Prozesse, die während einer Infektion stattfinden, auf molekularer Ebene untersucht werden.

Die Zerstörung von *tight junctions* z.B. im Zuge einer Infektion führt zu unzureichender Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten der epithelialen Barriere und gleichzeitig zu einem unkontrollierbaren Verlust von Wasser und Elektrolyten.

Außerdem induziert die Auflösung einer Barriere eine bakterielle Translokation, Sepsis und kann zu multiplen Organversagen führen (Soeters et al. 2007). Weiterhin bringt eine erhöhte Permeabilität des Darms diverse Autoimmunerkrankungen und Entzündungsreaktionen mit sich. Unter anderem handelt es sich dabei um chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. In CED wandern Neutrophile durch die Epithelschicht und induzieren Entzündungen auf der intestinalen Oberfläche. Diese Einwanderung ist mit einer Veränderung der *tight junction* Proteine verbunden, die die epitheliale Permeabilität gegenüber Ionen und Makromolekülen erhöhen (Kucharzik et al. 2001). Weitere Erkrankungen sind beispielsweise Allergien, Lebensmittelunverträglichkeiten, Typ 1 Diabetes (Berkes et al. 2013, Farhadi et al. 2003) und Autismus (White 2003).

Genau diese Problematik der Barrierauflösung durch verschiedene Faktoren wie Krankheiten oder Infektionen macht ein physiologisches *in vitro* Darmmodell zur Aufklärung der genauen Prozessabläufe notwendig. Dafür können die in dieser Arbeit generierten Darmepithelzellen mit ihren verschiedenen Eigenschaften verwendet werden, um, z.B. auch mit Einsatz von Zytokinen oder der Kokultivierung mit anderen Zelltypen wie Immunzellen oder Muskelzellen, einen Aufschluss über die Zusammenhänge der Permeabilität von Barrieren und spezifischen Infektionsabläufen zu liefern.

4.3 Immortalisierungsstrategien und Genintegration

Für viele Anwendungen werden physiologisch relevante Zelllinien benötigt. Zu den verschiedenen Anwendungen der Zelllinien gehören unter anderem die Produktion von Proteinen, Validierung von Wirkstoffzielen, Toxikologie-Studien, das Screening nach neuen Komponenten und therapeutische Zwecke in der regenerativen Medizin. Um die benötigten physiologisch relevanten Zelllinien erzeugen zu können, werden vor

allen die 3D-Kultivierung, Kokultivierung mit anderen Zelltypen und bestimmte Medienzusätze benötigt (Huh et al. 2010, Antonica et al. 2012).

Normalerweise werden Zellen in der Zellkultur mit einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 20,8 % kultiviert. Dies entspricht jedoch nicht den physiologischen Werten, da schon für verschiedene Zelltypen gezeigt wurde, dass auch die Sauerstoff-Konzentration bei der Kultivierung eine entscheidende Rolle spielt, sodass dies als Vorteil für die 3D-Kultivierung ausgelegt werden kann. Dabei werden besonders die Zellen mit weniger Sauerstoff versorgt, die innerhalb des murinen intestinalen Krypts lokalisiert sind. Dies wurde von Ivanovic 2009 in einem Review zusammengefasst, wobei beschrieben wird, dass besonders Stammzellen weniger als 0,5-7 % Sauerstoff ausgesetzt sind.

In einer anderen Studie von Colom et al. 2014 wurde bereits untersucht, welchen Einfluss die Kultivierung mit ECM-Gelen bei A549-Zellen auf die Sauerstoffdiffusion und den Sauerstoffverbrauch hat. Es wurde gezeigt, dass das Sauerstoff-Diffusionsvermögen in Gelen bis zu 40 % geringer ist, verglichen mit Wasser. Es wurden geringere Werte beobachtet je dichter die Gele waren. Bei der 3D-Kultivierung wurde eine physiologische Sauerstoffbedingung nach zwei Tagen in dichtem Gel (≥ 3 mg/ml) erreicht (Colom et al. 2014).

Aus diesem Grund wurde bei der Immortalisierungsstrategie aus der Infektion I9 die Zellen versucht möglichst Primär-ähnlich in Matrigel zur 3D-Kultivierung zu inkubieren. Somit sollte gesichert werden, dass während der Immortalisierung mittels Cl-SCREEN-Genbank die Stammzellen möglichst in hoher Anzahl erhalten bleiben. Außerdem sollte eine Dedifferenzierung bzw. möglichst gute Differenzierung der Stammzellen in die einzelnen Zelltypen des Dünndarms gewährleistet bleiben bzw. ermöglicht werden. In früheren Untersuchungen zu Stammzellen und den Einfluss von Hypoxia auf die Genexpression, wurde gezeigt, dass Hypoxia-induzierte Transkription einen direkten Einfluss auf die zelluläre Differenzierung besitzt (Wenger 2002, Sonna et al. 2003, Westfall et al. 2008).

Physiologisch relevante Zelllinien können über verschiedene Immortalisierungsstrategien generiert werden. Einerseits können sie aus Tumoren isoliert oder andererseits *in vitro* generiert werden. Tumor-abgeleitete Zelllinien zeigen genetische Instabilität sowie undefinierte genetische Veränderungen verglichen zum Ursprungsgewebe (Damia & D'Incalci 2010, Castro-Gamero et al. 2013, Heng et al. 2013, Stevens et al. 2013). Dies kann auf die in dieser Arbeit vorgestellten Zelllinien Caco-2

und HT-29-Zelllinie aus dem Dickdarm-Karzinom übertragen werden. Zwar werden diese Zelllinien momentan für die Medikamentenentwicklung verwendet, dennoch stammen sie aus Tumorgewebe und zeigen deshalb nicht unbegrenzt die Funktionen des ursprünglichen Gewebes. Caco-2 zeigt beispielsweise veränderte Protein- und Transporter-Expression (Larregieu & Benet 2013, Sun et al. 2002) und HT-29 wachsen bei Zusatz von Glucose undifferenziert und sobald Glucose entzogen und die Zellen konfluent sind, differenzieren sie zu Enterozyten. Außerdem zeigt diese Zelllinie eine niedrigere Enzymaktivität von Lactase (Zweibaum et al. 1985).

Die Immortalisierung kann beispielsweise durch Kultivierung spontan induziert werden (Todaro & Green 1963). Außerdem kann durch die Behandlung mit Kanzerogenen sowie die Einbringung spezifischer Gene (Zhou et al. 2013), die mit der Proliferationskontrolle interagieren, eine Immortalisierung von Zellen erfolgen (Loiola et al. 2013).

Neben einer spontanen Immortalisierung, kann das onkogene Potential von verschiedenen Viren genutzt werden. Ein Beispiel dafür ist die Immortalisierung von B-Lymphozyten mittels Epstein-Barr Virus (EBV) (Review von Traggiai 2012). Ein weiteres Beispiel zur Immortalisierung von z.B. HEK293-Zellen stellt die Verwendung von DNA-Bruchstücken des Adenovirus dar (Graham et al. 1977).

Für die CI-SCREEN-Immortalisierungstechnologie werden verschiedene Gene verwendet, die verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen wie z.B. Zellzyklus, Apoptose, Erhaltung von Stammzeleigenschaften und somit zur unbegrenzten Verfügbarkeit nach der Integration in das Genom führen (Klein 2012, Lipps et al. 2017 (in Revision)).

Für verschiedene Zelltypen wurde bereits gezeigt, dass die Einbringung unterschiedlicher Gene zur Immortalisierung der Zellen führt. Ein sehr häufig verwendetes Immortalisierungsgen ist das SV40 large T antigen (Tag), welches in den Zellzyklus eingreift, indem Proteine wie p53 und pRb beeinflusst werden (Review von Pipas 2009). Weitere virale Gene zur Immortalisierung sind E6 und E7 aus dem humanen Papillomvirus (HPV), wobei E6 die Wachstumskontrolle durch p53 unterbricht und E7 den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus begünstigt.

Als nicht virales Onkogen spielt hTert eine wichtige Rolle bei der Immortalisierung von Zellen. Die katalytische Untereinheit der Telomerase dient der Verlängerung der verkürzten Telomere aus der Replikation (Blasco et al. 1997), sodass einige Zellen wie beispielsweise humane primäre Fibroblasten durch die Einbringung unbegrenzt

kultiviert werden können (Bodnar et al. 1998). Weiterhin wurden mit dieser Strategie bereits z.B. humane Hautendothelzellen (Yang et al. 2001), humane mesenchymale Stammzellen (Simonsen et al. 2002) oder Keratinozyten (Kiyono et al. 1998) immortalisiert.

Das Immortalisierungspotential von viralen Onkogenen wie beispielsweise die frühe Region E1A des Adenovirus 2, large T Antigen des SV40 und Polyomaviren und die Onkoproteine E6 und E7 des humanen Papillomvirus Typ 16 und 18 wurden bereits erfolgreich zur Immortalisierung von epithelialen Zelllinien verwendet (Emami et al. 1989, Chastre et al. 1991). Die immortalisierte Epithelzelllinie SLC-11 zeigt einen Phänotyp von Zellen der intestinalen Mucosa, wie zytoplasmatisches Villin, Zytokeratine, das Enzym Enkephalinase und Oberflächenrezeptoren zur Erkennung von VIP (Emami et al. 1989). Die intestinalen CFI-3 Zellen behielten trotz Immortalisierung mit SV40 large T den typischen Phänotyp von CF bei, also die fehlerhafte Regulation des Chlorid-Kanals. Sodass diese Zelllinie ein geeignetes Modell für die Aufklärung der Funktion des CFTR Proteins, zur Entwicklung neuer therapeutischer Agenzien und zur Berichtigung des Gendefekts *in vitro*, darstellt (Chastre et al. 1991). Die in dieser Arbeit generierten Zelllinien (I9K8 und I9K17) zeigen auch eine CFTR-Expression, sodass diese als geeignetes *in vitro* Modell zur Aufklärung von CF genutzt werden können.

Neben den gängigen Onkogenen hTert, Tag und E6/E7 zur Immortalisierung wurden beispielsweise murine embryonale Endothelzellen mittels PymT (Williams et al. 1989) oder murine Makrophagen über die Einbringung von v-myc (Blasi et al. 1985) ins Genom unbegrenzt verfügbar gemacht. Die Immortalisierung mit v-myc konnte, im Gegensatz zur Verwendung von Tag (Gazdar et al. 2002), den Phänotypen der Makrophagen beibehalten (Blasi et al. 1987). Wichtig dabei zu erwähnen ist, dass dies Beispiele für Zelltyp-spezifische Onkogene sind, die nur in den entsprechenden Zelltypen funktionieren.

In vorherigen Arbeiten konnten bereits murine intestinale Zellen des Dünndarms über die CI-SCREEN-Technologie generiert werden. Schwerk et al. 2013 nutzte dafür murines E19 embryonales Dünndarmgewebe. Die Zellen zeigten charakteristische tight junctions, Mikrovilli und die Expression von Markerproteinen wie z.B. Connexin, Vimentin, NADPH-Oxidase, Dipeptidylpeptidase 4, Sis und Aminopeptidase. Für die Immortalisierung dieser Zellen wurden die Immortalisierungsgene Tag, Kruppel-like Faktor 4 (Klf4) und der *Inhibitor of DNA-binding 3* (Id3) integriert (Schwerk et al. 2013).

Im Gegensatz dazu, wurde für die in dieser Arbeit mittels der CI-SCREEN-Technologie-immortalisierten Darmzellen keine Integration des Onkogens Tag nachgewiesen, sodass dieses typischerweise für Nagetierzellen eingesetzte Immortalisierungsgen in diesem Fall nicht zur Immortalisierung benötigt wurde. Die fehlende Integration von Tag stellt einen wesentlichen Unterschied zu den zuvor etablierten murinen IECs dar. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei beiden Ansätzen um unterschiedliches Ausgangsmaterial handelte, zum einen embryonaler Darm (IECs) und zum anderen intestinale Organoidkulturen. Dies zeigt, dass der Einsatz von Zelltyp-spezifischen Immortalisierungsgenen zur funktionalen Immortalisierung führt und trotzdem völlig unterschiedliche Gene integriert sein können.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass eine Kombination von den beiden Genen E6 und E7 zur Immortalisierung von Epithelzellen führt (Liu et al. 2008). Bei den in dieser Arbeit neu generierten Zelllinien wurde in nahezu jedem der untersuchten Zellklone (96,15 %) die Integration des Gens E7 mittels PCR nachgewiesen. Dies deutet daraufhin, dass zur Immortalisierung von epithelialen Zellen aus dem Dünndarm das Gen E7 benötigt wird. Inwieweit die Expression von E7 essentiell für die Immortalisierung der Darmepithelzellen aus den Organoiden ist, kann mit den vorliegenden Daten nicht zweifelsfrei beantwortet werden. Vielmehr müssten Versuche durchgeführt werden, bei denen verschiedene Genkombinationen mit und ohne E7 untersucht werden, sodass eine entscheidende Rolle von E7 bei der Immortalisierung der Darmepithelzellen einwandfrei nachgewiesen werden kann.

Außerdem wurde bereits in Untersuchungen von Roig et al. 2010 gezeigt, dass Zellen des Dickdarms aus Biopsie-Proben immortalisiert werden konnten. Die Zellen wurden durch die Expression des nicht-onkogenen Proteins Cyclin-abhängige Kinase 4 (Cdk4) und der katalytischen Komponente von hTert für mehr als 1 Jahr kultiviert. Die generierten Dickdarm-Zellen waren in der Lage spezifische Epithelzellmarker wie Cytokeratin 18, ZO-1 und Mucine zu exprimieren und weiterhin Stammzellmarker wie Lgr5, Bmi1 und CD44 (Roig et al. 2010). Dies stellt eine gute Vorlage für die Immortalisierung anderer Zelltypen des Darmtraktes dar.

Für die Etablierung von verschiedenen Zelltypen (Enterozyten, Panethzellen, enteroendokrine Zellen und Gobletzellen) könnte die CI-SCREEN-Technologie mit Zelltyp-spezifischen Promotoren gekoppelt werden. Das bedeutet, dass bestimmte Immortalisierungsgene unter eine Zelltyp-spezifische Promotor-Kontrolle gestellt

werden. Zum Beispiel wurde der Promotor des *Surfactant Protein C* zur Expression von Tag verwendet. Diese Expressionskassetten führen in transgenen Mäusen zur Entwicklung von Lungentumoren. Aus diesen Tumoren wurden dann erfolgreich Zelllinien generiert (Wikenheiser et al. 1993).

4.3.1 Funktion der Immortalisierungsgene und Beeinflussung der Immortalisierung der Darmzellen

In dieser Arbeit wurden 10 verschiedene Immortalisierungsgene (Id1, Id2, Id3, Myc, Fos, E7, Rex, Nanog, Core und Tag) zur Etablierung muriner intestinaler Darmzellen verwendet. Im folgenden Abschnitt wird die Funktion einiger integrierter Gene (Id1, Id2, Nanog, Rex1 und cMyc) im Hinblick auf deren mögliche Beeinflussung der Immortalisierung der Darmzellen beschrieben.

Id2

Für die Analyse der integrierten Immortalisierungsgene der neu generierten murinen Darmzellen wurde in nahezu allen Zelllinien (96,15 %) Id2 nachgewiesen. Das lässt darauf schließen, dass dieses Gen einen positiven Einfluss auf die erfolgreiche Immortalisierung von Zellen des Dünndarms hat und somit eine funktionale Immortalisierung durch die Integration von Id2 unterstützt wird. Bereits in Untersuchungen von Russell et al. 2004 wurde gezeigt, dass Id2 im intestinalen Epithel als Retinoblastin-bindendes Protein die Tumorbildung vermeidet und die Zellen in Richtung Differenzierung lenkt (Russell et al. 2004). Weiterhin wurde in einer anderen Studie von Cao et al. 2009 der positive Einfluss von Id2 auf die Unterdrückung des TGF- β -Signalweges dargestellt. TGF- β reguliert die Homöostase des epithelialen Gewebes durch Aktivierung der Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung und Apoptose (Babyatsky & Podolky 1991, Ko et al. 1997). In Säugetieren wurden die Gene Id1, Id2, Id3 und Id4 in undifferenzierten und proliferierenden Zellen identifiziert (Hasskarl & Munger 2002). Oft ist der TGF- β Signalweg bei Krebs im Dickdarm gestört. Außerdem wurde herausgefunden, dass TGF- β die Expression von Id-Genen in verschiedenen Zelllinien unterdrückt (Lasorella et al. 2000, Ling et al. 2002). Ein Ausschalten der Genexpression von Id1 und Id2 induziert Apoptose in intestinalen Epithelzellen aus der Ratte, wobei eine Überexpression von Id2 die TGF- β -induzierte Apoptose schwächt (Cao et al. 2009). Dies zeigt erneut den positiven Effekt der Einbringung von

Id2 zur Immortalisierung von Epithelzellen aus dem Dünndarm, da somit die Einleitung des Zelltodes eher verhindert und eine Immortalisierung begünstigt wird.

Id1

Als weiteres Immortalisierungsgen wurde in dieser Arbeit Id1 zur Immortalisierung von murinen intestinalen Krypten verwendet. In vergangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Id1 das Stammzellpotential von embryonalen, neuralen und hämatopoetischen Stammzellen unterstützt (Lasorella et al. 2014, Ying et al. 2003, Romero-Lanman et al. 2012). Zhang et al. 2014 beschäftigten sich mit der Expression von Id1, wobei festgestellt wurde, dass sowohl in humanen als auch murinen Därmen die Expression von Id1 in Stammzellen der Krypten (+4 Stammzellen und TA-Zellen) nachweisbar ist. Id1-positive Zellen sind selbst-erneuernd und multipotente Stammzell-Vorläufer-Zellen, die dafür zuständig sind das intestinale Epithel zu erhalten. Weiterhin zeigte Zhang et al. 2014, dass Id1-positive Zellen Organoide bilden können, sodass dieses Gen als Marker für intestinale Stamm- und Vorläuferzellen angesehen werden kann. Zusammenfassend wurde von der Arbeitsgruppe festgehalten, dass Id1 zur RepARATION von Dickdarmverletzungen dient und beiträgt (Zhang et al. 2014). Dies qualifiziert dieses Gen als Angriffspunkt für die funktionale Immortalisierung der murinen intestinalen Kryptenkulturen, die weiterhin Stammzellpotential beibehalten sollen. Für die generierten Zelllinien konnte Id1 in 53,85 % der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, sodass sich die Integration dieses Immortalisierungsgen positiv auswirkt, da somit die Erhaltung der selbst-reproduzierenden Eigenschaft der Stammzellen unterstützt wird.

Nanog

Auch Nanog wurde in die neu generierten Zellen eingebracht, um eine erfolgreiche Immortalisierung zu erreichen. In die murinen intestinalen Darmzellen wurde Nanog mit einer Häufigkeit von 65,39 % integriert und trug zur Immortalisierung der Zellen bei. In früheren Untersuchungen von Romero-Lanman et al. 2012 wurde gezeigt, dass der Verlust von Nanog in embryonalen Stammzellen zur Differenzierung in Endoderm führt (Mitsui et al. 2003, Chambers et al. 2003). Außerdem sind Nanog- knockout ES-Zellen weiterhin in der Lage sich selbst zu erneuern und in alle drei Keimbahnen (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) zu differenzieren. Daraus geht hervor, dass Nanog nicht unbedingt für die eigenständige Erneuerung benötigt wird, aber an der Regelung bzw.

Gewährleistung der Selbsterneuerung und Pluripotenz von ES-Zellen beteiligt ist (Chambers et al. 2007).

Rex1

Ein weiteres Immortalisierungsgen ist Rex 1, welches in allen immortalisierten Zelllinien des murinen Dünndarms nachgewiesen wurde. Dabei handelt es sich um ein Zink-Finger-Protein, welches hauptsächlich in undifferenzierten Stammzellen exprimiert wird (Chen & Gudas 1996). Sobald Rex1 zerstört wurde, konnte eine Verbesserung bestimmter Ectoderm-, Mesoderm- und Endoderm-Marker nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Rolle von Rex 1 zur Erhaltung der Stammzellen. Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass Rex1 eine entscheidende Funktion bei der Beeinflussung von Differenzierung, Zellzyklus-Kontrolle und Krebsentstehung besitzt (Scotland et al. 2009).

cMyc

Die Entstehung von Krebs wird von DNA-Schädigungen begünstigt. Entzündungen, die durch zelluläre Stressfaktoren beeinflusst werden, können DNA-Schädigungen und genetische Instabilität vermitteln und somit genetische Mutationen und bösartige Zellveränderungen mit sich bringen (Lazebnik 2010, Basith et al. 2012). In den Zellen werden durch DNA-Schädigung bestimmte Protoonkogene wie beispielsweise c-Myc zusammen mit der Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen aktiviert. C-Myc ist an der Zellproliferation, Transformation und dem Zelltod beteiligt (Hermeking & Eick 1994). Zielgene des c-Myc Proteins sind an verschiedenen zellulären Funktionen wie Zellzyklus, Proteinsynthese, Zelladhäsion und microRNA-Expression beteiligt. Dieses Protoonkogen beeinflusst die physiologische intestinale Homöostase durch Regulation von Proliferation und Anzahl der Krypten (Dang et al. 2006). Außerdem ist es bei Entzündungen dereguliert und in Colitis-assoziierten Dickdarm-Adenokarzinomen überexprimiert (Sipos et al. 2016).

In einer Studie von Bettes et al. 2005 wurde gezeigt, dass c-Myc im proliferierenden *transient-amplifying* Bereich der Krypten exprimiert wird. Außerdem wurde festgestellt, dass c-Myc ein wichtiges Ziel für den traditionellen Wnt-Signalweg ist, der essentiell für die Entwicklung und Erhaltung der intestinalen Mucosa ist (Bettes et al. 2005). In weiteren Untersuchungen von Muncan et al. 2006 wurden c-Myc-defiziente Krypten erzeugt, die innerhalb von Wochen abstarben und durch Krypten ersetzt, die c-Myc

exprimierten. Dies erfolgte durch den Teilungsprozess der Krypten, die der Gen-Deletion entkommen waren. Somit kann festgehalten werden, dass c-Myc wichtig für die Vorläuferzellen der Krypten ist, um den Zellzyklus erfolgreich durchzulaufen (Muncan et al. 2006).

In 88,46 % der generierten murinen Darmepithelzellen wurde c-Myc nachgewiesen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass c-Myc entscheidend für den Erhalt der Vorläuferzellen ist. Somit trägt dieses Immortalisierungsgen erfolgreich zur Proliferation der Zellen bei und fördert die Immortalisierung von Vorläuferzellen der Krypten.

4.3.2 Regulation der Immortalisierung

In einigen Anwendungsgebieten wird kein unbegrenztes Wachstum von Zellen benötigt wie beispielsweise bei Transplantationen. Deshalb stellen Wachstumskontrollen eine wichtige Regulation der Immortalisierung dar, um eventuell einen stärkeren Differenzierungsstimulus in den generierten Zelllinien zu erzielen.

Es wurden Immortalisierungsstrategien entwickelt, die Wachstumskontrollen beinhalten, da die Erhaltung der physiologischen Eigenschaften nicht mit starker Proliferation einhergehen. Für Hepatozyten wurde gezeigt, dass proliferierende Zellen ihre typischen Eigenschaften für ausdifferenzierte Zellen verlieren, wobei nicht-proliferierende Hepatozyten spezifische Eigenschaften aufweisen (Klochender et al. 2012). Um die Proliferation und Differenzierung von Zellen zu beeinflussen, wurden drei Möglichkeiten zur Regulation des Wachstums herausgestellt.

Temperatur-basierte Regulation

Bei der Temperatur-basierten Regulation führt eine Temperatur-sensitive Mutante von Tag bei einer bestimmten Temperatur (32 °C) zur Proliferation und damit Immortalisierung (Tegtmeyer et al. 1975). Durch die Kultivierung der so immortalisierten Zellen bei 39 °C wird die Temperatur-sensitive Mutante des Tags inaktiviert und somit die Immortalisierung revertiert. Mit dieser Regulationsmethode wurden vor allem murine Zellen immortalisiert, da die alleinige Expression von Tag nur für die Immortalisierung von Nagerzellen ausreichend ist und für humane Zellen ein weiteres Onkogen benötigt wird. Beispielsweise konnten über die Temperatur-basierte Regulation Hepatozyten-Zelllinien (Yanai et al. 1991, Allen et al. 2000), eine

Astrozyten-Zelllinie (Langley et al. 2009) oder Stroma-Zelllinien (Istvanffy & Oostendorp 2013) generiert werden.

Rekombinase-basierte Kontrolle

Die reversible Immortalisierung von Primärzellen kann auch durch Retroviren vermittelt werden, wobei ein Onkogen übertragen wird, welches über zielgerichtete Rekombination später wieder herausgeschnitten werden kann. Dafür wird einerseits das Cre/LoxP-System oder andererseits das FLP/FRT-System verwendet. In einer Studie von Westerman & Leboulch 1996 stellte sich jedoch nur das Cre/LoxP-Rekombinationssystem als effizient in primären Zellen heraus. Diese Systeme erlauben eine vorübergehende und kontrollierte Expansion von Primärzellen ohne, dass das übertragene Onkogen beibehalten wird. Somit ermöglicht diese Immortalisierungsstrategie die Beeinflussung von Gentherapie von Zellen, die nicht auf exogene Wachstumsfaktoren reagieren. Die Verbindung von retroviraler Übertragung und zielgerichteter Rekombination erlaubt eine verlängerte Genexpression zur verbesserten Analyse (Westerman & Leboulch 1996).

Als weitere Möglichkeit der Rekombinase-basierten Kontrolle wird Cre-ERT2 stabil in die Zellen integriert und das Immortalisierungsgen von loxP umgeben. Somit kann das zur Immortalisierung führende Gen homogen und effizient entfernt werden (Wu et al. 2011). Nachteile dieser Regulationsmethode sind die Irreversibilität und es sollten nur eine einzelne oder geringe Kopienanzahl der Immortalisierungsgen-Kassette integriert sein.

Posttranslationale und transkriptionale Regulation

Die dritte Variante zur Immortalisierungskontrolle ist die posttranslationale und transkriptionale Regulation. Für die posttranslationale Regulation wird ein Estrogen-Rezeptor an ein Immortalisierungsgen fusioniert. Zellen, die mit dieser Mutante transduziert wurden, können über die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen zum unbegrenzten Wachstum angeregt werden, sodass darüber die Zellproliferation induziert wird. Sobald 4-Hydroxytamoxifen entzogen wird, ist das Immortalisierungsgen nicht mehr aktiv. Mit dieser Methode konnten bereits murine Makrophagen, Neutrophile und hämatopoetische Vorläufer-Zelllinien generiert werden (Wang et al. 2006). Für die transkriptionale Regulation werden synthetische Promotoren/Transaktivator-Systeme benötigt (Gossen & Bujard 1992). Dabei wird die

Genexpression durch den Tetracyklin-Promotor und einen synthetischen Transaktivator kontrolliert. Durch die Behandlung mit Doxycylin, ein Derivat von Tetracyklin, bindet der synthetische Transaktivator an das Tetracyklin-Derivat und die Expression des Immortalisierungsgens wird induziert (May et al. 2004, 2010).

4.4 Einfluss der Beschichtung auf die Adhäsion der murinen intestinalen Kryptenkultur

Mithilfe einer Beschichtung von Zellkulturschalen kann das Plastik dahingehend modifiziert werden, dass es die ECM des Organismus nachbildet bzw. dieser ähnelt. Unter der ECM werden verschiedene Strukturproteine verstanden, die den Zellen ein Grundgerüst geben und dem Gewebe eine bestimmte strukturelle Form verleihen. Um die *in vitro* kultivierten Zellen möglichst nah am *in vivo* System zu halten, ist eine Verwendung von Zellkulturbeschichtungen empfehlenswert. In dieser Arbeit wurden verschiedene Beschichtungsmöglichkeiten wie Gelatine, Kollagen und Fibronectin untersucht. Gelatine besteht hauptsächlich aus denaturiertem Kollagen und wird aus tierischem Bindegewebe gewonnen.

Kollagen ist ein Strukturprotein der ECM und wird für die Herstellung von Gelatine verwendet. Es ist der Hauptbestandteil des Bindegewebes der Säugetiere, wobei Kollagen auch das wichtigste strukturelle Protein im Dünndarm darstellt. Dieses Protein kann in Untergruppen wie beispielsweise fibrilläre (Kollagen I, Kollagen II, Kollagen III), netzbildende (Kollagen IV, Kollagen VIII) und fibrillen-assoziierte (Kollagen VI, Kollagen IX, Kollagen XII) Kollagene unterteilt werden.

Dabei ist das wichtigste Kollagen das fibrilläre Kollagen I aus Haut, Sehnen und Knochen (Badylak et al. 2009, Votteler et al. 2010). Die Verwendung zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen ist eine gängige Methode, da es biokompatibel, biologisch abbaubar und Zellen an sich binden kann (Lutolf & Hubbell 2005, Balda & Matter 2003).

Als weiteres Kollagen spielt das Kollagen IV der Basallamina eine wichtige Rolle. Es gibt dem intestinalen Epithel Festigkeit in der Struktur und ist wichtig für die Polarisierung der Epithelzellen (Mouw et al. 2014).

Für die Nutzung als Beschichtungsmaterial sind die hohen Gewinnungskosten aus den Geweben wie Knorpel oder Haut sowie die Reproduzierbarkeit nachteilig. Die Isolation aus natürlichem Gewebe bringt immer eine Variabilität in deren Struktur mit sich.

Fibronectin ist ein Glykoprotein der ECM, welches eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Es kommt in den meisten Körperflüssigkeiten, der ECM und auf Zelloberflächen vor, wobei es Bindestellen für verschiedene Zellen und Moleküle wie Heparin, DNA, Kollagen, Aktin, Fibrin sowie Bakterien und Zelloberflächen liefert (Dean 1989). Bei der Beschichtung von Zellkulturgefäßen verbessert dieses Matrixprotein die Zellanheftung, Bewegung und die Organisation des Zytoskeletts, wobei die zelluläre Proliferation und Differenzierung beeinflusst wird (Hynes & Yamada 1982, Hynes 1985, Kornblihtt et al. 1996). Fibronectin kommt zum einen als zelluläres Fibronectin oder zum anderen als Plasma-Fibronectin vor. Zelluläres Fibronectin wird durch viele verschiedene Zelltypen produziert wie z.B. Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen und Makrophagen sowie von einigen Epithelzellen. Die Zellen setzen Fibronectin als fibrilläre Form zusammen, die an der basalen Zelloberfläche akkumuliert. Eine Matrix wird gebildet, indem Fibronectin an Rezeptoren der Zelloberfläche bindet und das Zelloberflächen-gebundene Fibronectin in Fibrillen organisiert wird (Sottile & Mosher 1993). In einer Studie von Walia et al. 2004 wurde der Einfluss von Adenosin auf die Fibronectin-Synthese, die Polarität der Fibronectin-Sekretion und die nachfolgenden Effekte des sekretierten Fibronectins untersucht. Adenosin wird während Entzündungen hochreguliert. Für diese Studie wurden polarisierte T84 Zellen als Modell für das intestinale Epithel verwendet. Die Zugabe von Adenosin führte zur Ansammlung von Fibronectin im Zellkulturüberstand. Außerdem wurde gezeigt, dass die Stimulation mit Adenosin und die damit einhergehende Akkumulation des apikalen Fibronectins, die Anheftung und Invasion von *Salmonella Typhimurium* in die kultivierten Epithelzellen verbessert (Walia et al. 2004).

Bevor die murinen intestinalen Krypten mittels lentiviraler Transduktion immortalisiert wurden, wurde getestet auf welcher Beschichtung die Zellen möglichst optimal anwachsen. Die Überführung der 3D-Kultivierung auf beschichtete 2D-Kulturgefäße sollte die Handhabbarkeit zur Immortalisierung möglichst vereinfachen und gleichzeitig die Krypten phänotypisch so gering wie möglich verändern. Dabei wurden die Zellkulturgefäße mit ECM-Proteinen beschichtet und das Adhäsionsverhalten der Krypten untersucht. Die Zellen wurden auf Gelatine, Kollagen I, einer Mischung aus Fibronectin/Kollagen I und Kollagen G kultiviert. Bei Kollagen G handelt es sich um Kollagen I, welches zur Gelbildung auf der Zellkulturschale eingesetzt wird.

4.4.1 Gelatine

Bei der Verwendung von Gelatine als Beschichtungsmaterial handelt es sich um ein Gemisch aus tierischen Proteinen, wobei hauptsächlich Kollagen aus Bindegewebe enthalten ist. Richler und Yaffe zeigten 1970, dass sich eine Beschichtung mit Gelatine positiv auf die Kultivierung von Muskelzellen auswirkt. Weiterhin wurde die Kultivierung von Endothelzellen durch eine Gelatine-Beschichtung laut Folkman et al. 1979 verbessert. In einer Studie von Wang et al. 2016 wurde dargestellt, dass Gelatine L929-Zellen (Mauszelllinie aus dem Fettgewebe) vor TNF α -induzierter Zytotoxizität schützt und zelluläre Funktionen reguliert.

Aufgrund dieser drei Beispiele zur Verbesserung der Adhäsion und der Proliferation von Zellen wurde, wie oben beschrieben, eine Gelatine-Beschichtung als Möglichkeit der Zellkulturbeschichtung in Erwägung gezogen und in dieser Arbeit analysiert.

4.4.2 Kollagen I

Als weitere Beschichtungsmethode in dieser Arbeit wurde aufgereinigtes Kollagen I verwendet. Es handelt sich dabei um ein Strukturprotein aus der ECM, welches am häufigsten vorkommt (Badylak et al. 2009, Votteler et al. 2010). Es wurde von einigen Gruppen gezeigt, dass die Beschichtung der Gefäße mit denaturiertem Kollagen zu einer besseren Anheftung von beispielsweise Epithelzellen (Freeman et al. 1976, Lillie et al. 1980) und Muskelzellen (Hauschka & Konigsberg 1966) führt. Macklis et al. beschrieben 1985 eine Kollagen-Beschichtung als besonders förderlich für die Langzeitkultivierung von Nervenzellen. Allerdings gibt es hierzu widersprüchliche Publikationen, die zeigen, dass nicht-denaturiertes Kollagen förderlich ist und die Verwendung vorteilhaft für die morphologische Differenzierung von Mamma- (Yang et al. 1981) und anderen Epithelien (Sattler et al. 1978) ist. Außerdem wurde bei einigen anderen Zelltypen nachgewiesen, dass eine Beschichtung mit Kollagen zur Expression Zelltyp-spezifischer Eigenschaften führt (Meier & Hay 1974, Kosher & Church 1975) und erst eine Kultivierung bzw. Differenzierung der Zellen ermöglicht (Balda & Matter 2003, Lutolf & Hubbell 2005). Es stellte sich heraus, dass die murinen intestinalen Kryptenkulturen sehr gut mit einer Beschichtung von Kollagen in 2D kultivierbar sind.

4.4.3 Fibronektin

Bei Fibronektin handelt es sich um ein Glykoprotein der ECM, welches als Adhäsionsprotein neben beispielsweise Laminin oder ein weiteres Glykoprotein

namens Vitronectin die Anheftung von Zellen ermöglicht. Viele der Proteine aus der ECM haben eine Adhäsionsfunktion (Labat-Robert et al. 1990). Liberio et al. zeigten 2014 eine interessante Studie über die Testung verschiedener Beschichtungsmethoden in Hinblick auf die Proliferation, Anheftung, Morphologie, Bewegung, transkriptionale Antwort bzw. Genexpression und Zusammensetzung des Zytoskeletts. Dabei ging hervor, dass Fibronectin einen positiven Einfluss auf die Anheftung der untersuchten Krebszelllinie LNCaP aus einer Lymphknotenmetastase besitzt. Außerdem wurde durch die Verwendung eine Veränderung der Zellmorphologie in Bezug auf die vergrößerten Zellkerne und Zellgröße festgestellt. Es wurden weiterhin eine höhere Expression von F-Aktin und reduzierte Beweglichkeit nachgewiesen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Fibronectin-Beschichtung einen positiven Einfluss auf die Anheftung der Krebszellen zeigte (Liberio et al. 2014).

Die murinen intestinalen Krypten wuchsen zwar auf Gelatine-beschichteten Zellkulturgefäßen an, jedoch in leicht geringerer Anzahl als bei den anderen verwendeten Beschichtungen. Deshalb wurde entschieden, dass ausschließlich Gelatine nicht ausreicht, um das murine intestinale Primärmaterial optimal adhärent wachsen zu lassen. Der positive Effekt von Kollagen I und Fibronectin auf die Anheftung der Zellen wurde auch für die murinen intestinalen Krypten festgestellt, sodass eine möglichst komplexe Beschichtung aus einer Mischung von Fibronectin/Kollagen vorerst die bestmögliche Wahl zur Kultivierung der Zellen darstellte.

In Untersuchungen zur ECM von Epithelzellen, wurde bereits von Walia et al. 2004 gezeigt, dass Epithelzellen in der Lage sind ihre eigene ECM zu bilden. Aus diesem Grund wurde für die spätere Kultivierung der generierten immortalisierten intestinalen Zelllinien untersucht, ob diese Zellsysteme auch ohne eine Beschichtung der Zellkulturgefäße kultiviert werden können, ohne dabei einen Verlust Zelltypspezifischer Eigenschaften mit sich zu ziehen. Diese Versuche wurden durchgeführt, da hierdurch die Zellsysteme eine vereinfachte Handhabung aufweisen.

Die Zellen konnten auf Transwells ausgesät werden und zeigten auch ohne Beschichtung weiterhin eine dichte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über die Messung des transepithelialen Widerstandes sowie eine starke Expression des *tight junction* Proteins ZO-1. Auch die Sekretion von Mucus wurde trotz unbeschichteter Zellkulturgefäße mittels Alcianblaufärbung eindeutig nachgewiesen. Trotz Langzeit-

kultivierung in definiertem Medium und ohne Beschichtungen zeigten die generierten murinen intestinalen Zellen nach erneuter Einbringung in Matrigel typische Organoid-Strukturen. Neben der einfacheren Handhabung hat die Verwendung unbeschichteter Zellkulturgefäße den Vorteil, dass mit definierten Materialien gearbeitet werden kann. Beschichtungen mit ECM-Molekülen unterliegen starken Schwankungen, da die ECM-Proteine aus Tieren/Spendern isoliert werden müssen und dabei spenderbedingte Variationen in der genauen Zusammensetzung entstehen. Somit können die Zellen für komplexe Untersuchungen zunächst günstig zweidimensional expandiert werden und danach bei Bedarf für genauere Analysen in die komplexe 3D-Umgebung überführt werden.

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass die Zelltyp-spezifischen Eigenschaften wie beispielsweise die Sekretion von Mucus oder die Barriereausbildung trotz unbeschichteter Zellkulturgefäße erhalten bleiben. Deshalb wurde in den nächsten Schritten auf die Beschichtung verzichtet.

4.5 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die physiologischen Eigenschaften der generierten murinen intestinalen Zelllinien

In der natürlichen Umgebung von Zellansammlungen sind diese Verbände sehr vielen Signalstoffen und Effektormolekülen ausgesetzt. Diese Signalmoleküle wie beispielsweise verschiedene Hormone, Zytokine oder Wachstumsfaktoren haben einen starken Einfluss auf die Zellen. Um die Zellen *in vitro* zu kultivieren, sollte die komplexe *in vivo* Umgebung möglichst optimal nachgebildet werden. Dafür werden in das Medium möglichst wichtige Zusätze eingebracht. Ein besonders komplexer Zusatz stellt die Verwendung von fetalem Kälberserum (FCS) dar. Dieses FCS wird aus dem Blut von Kälberfeten gewonnen. FCS besitzt einige Vorteile, denn durch die komplexe Zusammensetzung wird den Zellen ein reiches Paket an allen wichtigen Stoffen geboten und weiterhin dient FCS zum Kryokonservieren und Abstoppen des Trypsinierungsvorganges, da es nützliche Proteaseinhibitoren enthält. Dennoch bringt der Einsatz von FCS auch einige Nachteile mit sich, da es ein komplexes Gemisch ist, welches sowohl in seiner Zusammensetzung als auch in den Konzentrationen der enthaltenen Stoffe starken Schwankungen unterliegt. Durch diese chargenabhängigen Schwankungen ist die Reproduzierbarkeit erschwert.

Trotz der Nachteile wurde in dieser Arbeit nicht auf den Einsatz von FCS verzichtet und die Medien mit 5-10 % FCS versetzt. Denn in der Masterarbeit von Lenfers 2017

wurde gezeigt, dass die generierten Darmzellen (I9K5 und I9K18) nicht ohne FCS-Zusatz kultiviert werden können, da somit ein Verlust spezifischer Gobletzell-Marker (Muc2 und Tff3) auftrat. Weiterhin kam es zum Verlust der Zelladhäsion nach Entfernung von FCS bzw. Verringerung der FCS-Konzentration im Medium, da in FCS viele Adhäsionsfaktoren enthalten sind.

Neben FCS sollten auch weitere Zusätze in die Medien eingebracht werden, um die Zelltyp-spezifischen Eigenschaften zu erhalten. Zu Beginn wurden die murinen intestinalen Krypten in 3D mit Stammzell-Medium kultiviert, um die Stammzellen möglichst lange zu erhalten und auch nach der Immortalisierung eine Differenzierung dieser zu ermöglichen. Somit sollte ein Verlust der Stammzellen aus der murinen Kryptenkultur während des Immortalisierungsprozesses verhindert werden. Im Stammzellmedium waren neben anderen wichtigen Faktoren, Noggin und R-Spondin enthalten, die eine essentielle Aufgabe bei der Erhaltung von intestinalen Stammzellen besitzen (Sato et al. 2009). Noggin inaktiviert das BMP4-Protein und somit auch den BMP/Smad-Signalweg, der die Stammzellen proliferativ hält (He et al. 2004).

Ein notwendiger Signalweg ist der Wnt-Signalweg, der die Proliferation von intestinalen Kryptzellen reguliert (Pinto et al. 2003, Korinek et al. 1998, Hoffman et al. 2004). Ein wichtiges Zielgen des Wnt-Signalweges ist Lgr5 der Stammzellen (Barker et al. 2007). R-Spondin stellt normalerweise einen wichtigen Zusatz als Medienbestandteil dar, da es die Stammzellen während der Kultivierung erhalten soll (de Lau et al. 2011). Die neu generierten murinen intestinalen Darmzellen werden im definierten Medium ohne R-Spondin kultiviert und zeigen trotzdem stammzellartige Eigenschaften wie die Expression von Lgr5 und bilden im Matrigel erneut Organoid-Strukturen nach einer Woche Kultivierung. Dies deutet daraufhin, dass die Integration der Immortalisierungsgene, den Wnt-Signalweg so verändert hat, dass der teure Medienzusatz R-Spondin für die Stabilisierung von β -Catenin und somit Expression von wichtigen Wnt-Zielgenen nicht mehr benötigt wird. Aus diesem Grund können die immortalisierten intestinalen Zelllinien für Hochdurchsatz- Analysen verwendet werden, da sie in definiertem und kostengünstigerem Medium kultiviert werden können und gleichzeitig ihre Stammzell-Kapazität nicht verlieren, da sie in komplexer 3D-Umgebung erneut Organoide formen.

Ein wesentlicher Punkt ist, dass die beiden Faktoren kostenintensiv sind und damit eine Nutzung der Zellsysteme Anwendungen verhindern, die große Zellmengen benötigen. Um eine günstigere Kultivierung zu ermöglichen, wurden verschiedene

Medien getestet, wobei darauf geachtet werden sollte, dass die Proliferation und Zelltyp-spezifische Eigenschaften erhalten bleiben. Dabei stellte sich heraus, dass H/Dadvanced mit 10 % FCS, EGF, N-Acetylcystein, Rock-Inhibitor (Koyanagi et al. 2008), Insulin, N2- und B27-Zusatz für die Kultivierung von murinen intestinalen Zelllinien geeignet ist. H/Dadvanced enthält bereits Glucose, Nicht-Essentielle-Aminosäuren (NEAA) und Natriumpyruvat. Dabei dient Glucose als Energiequelle, NEAA als Entlastung für den Zellstoffwechsel und Natriumpyruvat als Ausgangsstoff für die Herstellung bestimmter Aminosäuren. Glutamin ist essentiell zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, da es bei Entzug die Expression des *tight junction* Proteins Claudin-1 verringert und die Permeabilität von kultivierten Caco-2 Zellen erhöht wird (Li & Neu 2009, DeMarco et al. 2003, Li et al. 2003). Weiterhin sind 10 % FCS enthalten, um wichtige Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle zur Verfügung zu stellen. Der Zusatz von N-Acetylcystein dient als antioxidatives Reagenz. Die Zugabe von EGF ist für die Regulierung des Zellwachstums sowie Apoptose, Proliferation und Differenzierung notwendig (Alexander et al. 2015, Arda-Pirincci & Bolkent 2014). EGF besitzt eine schützende Funktion bei der Entstehung und Erhaltung epithelialer Homöostase im Dünndarm (Duh et al. 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass EGF eine entscheidende Rolle als effektiver intestinaler Regulator spielt, wobei dieser hilft die intestinale Barriere aufrecht zu erhalten, um die Absorption von Nährstoffen zu gewährleisten und eine gesunde Immunabwehr zu stärken (Chen et al. 2014, Kaur et al. 2014).

Die Zugabe von ROCK (Y-27632) als Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase dient der Unterbindung von Apoptose und verbessert somit das Überleben von Zellen. Ähnlich wie bei der Apoptose kann durch Zusatz von ROCK Anoikis verhindert werden, was zuvor in Epithelzellen des Dickdarms beobachtet wurde (Hofmann et al. 2007).

Die verwendeten Zusätze N2 und B27 enthalten viele unterschiedliche Faktoren, die einen positiven Einfluss auf die Zellkultur haben und trotzdem eine Kultivierung unter möglichst definierten Bedingungen erlaubt. N2 beinhaltet unter anderem Insulin, Transferrin und Selenit. Insulin ist wichtig für die Aufnahme von Glucose und Aminosäuren in die Zelle. Da es seine Bioaktivität schnell verliert, wird es in einer hohen Konzentration benötigt. Als Eisenlieferant wird Transferrin hinzugefügt und Selenit als Co-Faktor für selenabhängige Enzyme wie die Gluthation-Reduktase (Barnes & Sato 1980). B27 enthält Vitamine (Vitamin E, A), wiederum Insulin, Transferrin und Selenit sowie verschiedene Hormone (Corticosteron, Progesteron).

Somit kann eine optimale Versorgung des Zellstoffwechsels gewährleistet werden und gleichzeitig das Medium durch die definierte Zusammensetzung eine bessere Handhabung und Anwendbarkeit gewährleisten.

Die Integration der Immortalisierungsgene hat scheinbar zur Veränderung einiger Signalwege geführt, da die erhaltenen Zelllinien auch ohne teure Medienzusätze wie R-Spondin und Noggin gut proliferieren und weiterhin Stammzell-Kapazität besitzen. Dies macht die Zellen besonders gut handhabbar und auch für Hochdurchsatzanalysen einsetzbar. Dabei ist auch festzuhalten, dass die Zellen flexibel in 2D- oder 3D-Umgebung kultiviert werden können ohne ihre Stammzeleigenschaften zu verlieren. Somit kann auf den Einsatz des komplexen Matrigels verzichtet werden. Das neu etablierte System ist somit vielseitig einsetzbar und kann an die Bedürfnisse des Anwenders angepasst werden.

4.6 TA-Vorläuferzellen mit Darmepithel-Eigenschaften

Dreidimensional kultivierbare *in vitro* Organoide können aus pluripotenten Stammzellen oder adulten Stammzellen entstehen. Damit wird eine *ex vivo* Morphogenese von Organen und eine Analyse der Entstehung dieser ermöglicht. Zu Beginn wurden adulte epidermale Stammzellen (Rheinwald & Green 1975) und embryonale Stammzellen (Evans & Kaufman 1981, Martin 1981) zweidimensional kultiviert. Damit wurde schon ein erster Schritt in Richtung erfolgreicher Untersuchung von Erhaltung und Differenzierung von Stammzellen geliefert. Dennoch machte die Kultivierung auf einer Feederschicht aus murinen 3T3 Fibroblasten (Todaro & Green 1965) eine vollständige Charakterisierung nicht möglich und die Stammzellen mussten dafür in Mäuse transplantiert werden, um die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Möglichkeit in verschiedenste Zellarten zu differenzieren zu zeigen (Lajtha 1979). Die Organoid-Technologie ermöglicht eine Langzeitkultivierung von Stammzell-basierten Organ-typischen Kulturen ohne Verwendung von Feederschichten (Kretzschmar & Clevers 2016). Als entscheidender Marker für intestinale Stammzellen wurde der Rezeptor Lgr5 identifiziert (Barker et al. 2007). Es werden ruhende (quiescent) und asymmetrisch teilende Stammzellen unterschieden. Stammzellen teilen sich normalerweise selten und wenn sie sich teilen dann asymmetrisch, das heißt, dass die Teilung einer Stammzelle zur Entstehung einer sich schnell teilenden Zelle (TA-Zelle) und einer anderen Zelle, die die alte Stammzelle ersetzt, führt (Abbildung 48). Die TA-Zellen sind dafür verantwortlich geschädigte oder abgestoßene Zellen zu ersetzen.

Bevor diese Zellen terminal differenzieren, durchleben sie einige Zellteilungen (Barker et al. 2010).

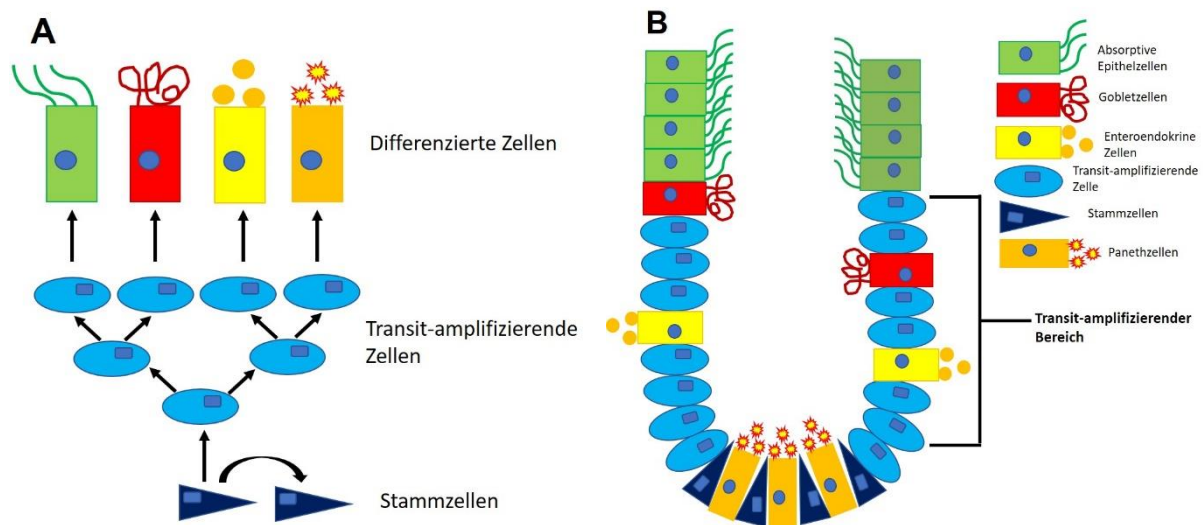


Abbildung 48: Darstellung der Teilung von Stammzellen und Aufbau der Stammzellnische im Krypt

Die Stammzellteilung und der Kryptaufbau sind schematisch dargestellt. **(A)** Stammzellen sind selbsterneuernd bei gleichzeitiger Generierung von sich teilenden TA-Vorläuferzellen. Diese Teilung erfolgt asymmetrisch, das bedeutet es entsteht jeweils eine neue Stammzelle und gleichzeitig eine TA-Zelle. Die TA-Zellen durchlaufen dann mehrere Zellteilungen bis sie in die reifen Zelltypen des Dünndarms (Panethzellen, Enteroendokrine Zellen, Gobletzellen und Enterozyten) differenzieren. **(B)** Die Lgr5-positiven Stammzellen befinden sich in der Stammzellnische weit unten, wobei die TA-Zellen oberhalb lokalisiert sind und erst die ausdifferenzierten Zellen im Bereich der Villi zu finden sind. (angepasst und modifiziert nach Barker et al. 2010).

Die in dieser Arbeit generierten murinen intestinalen Zellen zeigen verschiedene Eigenschaften der unterschiedlichen Zelltypen. Beispielsweise sind die Zellen in der Lage eine dichte Barriere auszubilden (Enterozyten), Schleim zu sekretieren (Gobletzellen), CD24 zu exprimieren (Panethzellen) und zielgerichtet Serotonin auszuschütten (Enteroendokrine Zellen).

Mehrere der neu immortalisierten Zelllinien weisen gleichzeitig spezifische Eigenschaften der unterschiedlichen oben genannten Zelltypen auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Zelllinien nicht um terminal ausdifferenzierte Zellen eines Typs (z.B. Goblet oder Panethzelle) handelt. Die Daten legen vielmehr die Hypothese nahe, dass es sich um stammzellartige Vorläuferzellen handelt, die den TA-Zellen ähneln. Die TA-Zellen wandern aus der Stammzellnische hoch zu den Villi und während dieses Vorgangs differenzieren diese Zellen in die unterschiedlichen Zelltypen. Diese Multipotenz kann auch bei den immortalisierten Zellsystemen beobachtet werden, wobei in weiteren Untersuchungen geklärt werden

muss, inwieweit das volle Differenzierungspotential der TA-Zellen erhalten geblieben ist.

Interessanterweise konnten Tetteh et al. 2016 zunächst *in vivo* zeigen, dass Enterozyten in der Lage sind den Verlust von Lgr5- positiven Stammzellen auszugleichen. Dabei kann die intestinale Alkaline-Phosphatase (Alpi)-exprimierende Enterozyten-Zelle dedifferenzieren und die Stammzellnische als Lgr5-positive Stammzelle kolonisieren (Tetteh et al. 2016). Danach wurde die Dedifferenzierung von Alpi-positiven Enterozyten mittels intestinaler Organoidkultur auf *in vitro* Kultivierung übertragen. Dafür wurden intestinale Krypten aus der Maus isoliert, die eine Tamoxifen-induzierbare Kasette unter der Kontrolle eines Alpi-Promotors, einen Rosa26-Promotor zur Cre-induzierbaren Linienverfolgung (Kretzschmar & Watt 2012, Snippert & Clevers 2011) und weiterhin ein Konstrukt, welches den Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor unter der Kontrolle des Lgr5-Promotors exprimiert. Die Behandlung mit DT führt zum Verlust von Lgr5-positiven Stammzellen in den intestinalen Krypten (Tian et al. 2011). DT hemmt die Proteinsynthese durch die Blockierung der Translation. Die Organoiden wurden mit Tamoxifen und DT behandelt und drei Tage später analysiert. In den Lgr5-DT-exprimierenden Organoiden waren nach DT-Behandlung keine Stammzellen mehr nachweisbar und die Enterozyten dedifferenzierten und ersetzten die fehlenden Stammzellen in der Krypte (Tian et al. 2011).

Die in dieser Arbeit immortalisierten murinen intestinalen Kryptenzellen zeigen sowohl Stammzeleigenschaften, da sie den Stammzellmarker Lgr5 exprimieren und bilden teilweise in Matrigel erneut Organoid-Strukturen (I9K6, I12K2, I12K9). Dies deutet daraufhin, dass es sich um stammzellartige Vorläuferzellen handelt. Da die generierten Zellen weiterhin verschiedene Eigenschaften von beispielsweise Enterozyten zeigen, da sie das *tight junction* Protein ZO-1 sowie das Zelladhäsionsmolekül Ecadherin exprimieren und eine dichte Zell-Zell-Barriere ausbilden, die mittels TEER-Messung nachgewiesen wurde. Gleichzeitig konnte das von enteroendokrinen Zellen sekretierte Hormon Serotonin über die Durchführung eines ELISA nachgewiesen werden. Außerdem waren die generierten Zellen positiv für den Panethzell-Marker CD24, das als Oberflächenprotein mittels durchflusszytometrischer Analyse analysiert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Immortalisierung wahrscheinlich die sich schnell teilenden TA-Zellen lentiviral transduziert und somit unsterblich gemacht wurden.

Um den Beweis voranzutreiben, dass es sich eindeutig um stammzellartige Vorläuferzellen bzw. TA-Zellen handelt, können Untersuchungen in 3D unterstützend wirken. Dabei könnten die Stammzellen mit einem Reporter am Lgr5-Promotor markiert werden und die Wanderung bzw. Differenzierung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Außerdem könnten Versuche durchgeführt werden bei denen die Stammzellen geschädigt werden, wie beispielsweise Bestrahlung oder wie bei Tian et al. 2011 über die Einbringung eines Rezeptors für DT gezeigt. Sobald keine Stammzellen mehr vorhanden sind, sollten auch keine Krypten in Matrigel mehr gebildet werden. Sollten trotzdem noch Krypten gebildet werden, könnte es sich eindeutig um stammzellartige Vorläuferzellen handeln, die in der Lage sind zurück in die Lgr5-positiven Stammzellen zu dedifferenzieren. Weiterhin könnte versucht werden über Medienzusätze eine vollständige Differenzierung der Zellen zu erreichen, wobei die Zellen dann nur noch Eigenschaften eines ganz bestimmten Darmzelltyps zeigen sollten.

4.7 Vergleich der generierten intestinalen Darmzellen mit ModeK, HT-29 und Caco-2

Die ModeK Zelllinie wurde aus dem Dünndarm von C3H/HeJ Mäusen abgeleitet. Die Generierung erfolgte durch die Immortalisierung mittels SV40 large T Antigen über einen murinen ekotropischen Virus. Dabei konnten morphologische und phänotypische Eigenschaften wie beispielsweise interzelluläre Kontakte, die Expression von Cytokeratin, Villin, des poly-Ig Rezeptors sowie VIP-Rezeptoren von normalen Enterozyten erhalten bleiben (Vidal et al. 1993). Sie wurden in einer Studie von Crockett et al. 2017 verwendet, um verschiedene Anregungen durch beispielsweise das Mikrobiom oder Nahrungskomponenten sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Dafür wurde die Antwort auf den Tumornekrosefaktor TNF- α und LPS von *E. coli* analysiert. Es wurde gezeigt, dass die Zellen auf das proinflammatorische Zytokin TNF- α aus der Mucosa sowie LPS als Endotoxin reagieren.

Dies stellt eine interessante Analyse dar, um die in dieser Arbeit etablierten Zellen weitergehend zu charakterisieren und den Effekt der genannten Moleküle auf das Genexpressionsmuster, die Barriereigenschaften oder die Mucusproduktion zu untersuchen.

Neuere Studien verdeutlichen, dass das Mucosa-Immunsystem und das Mikrobiom eine wichtige Rolle bei der Regulierung verschiedener Zellsignalwege spielen (Crockett et al. 2017). In einer weiteren Untersuchung von Nguyen et al. 2014 wurde die Modulation des microRNA-Profiles von Patienten mit Morbus Crohn bei einer *E. coli*-Infektion in ModeK Zellen untersucht. Dabei sollte der Mechanismus aufgeklärt werden, der die Modulation des microRNA Profils durch eine die *E. coli*-Infektion hervorruft und die Immunantwort des Wirts verändert. Es wurde festgestellt, dass die Infektion mit *E. coli* zur Hochregulation von microRNAs führt, die zur Verringerung der Protein-Expression von ATG5 und ATG16L führen. Diese sind notwendig für Autophagozytose in intestinalen Epithelzellen. (Nguyen et al. 2014). Eine funktionale Autophagozytose wird zur Unterdrückung der intrazellulären Replikation von *E. coli* benötigt (Lapaquette et al. 2010 & 2012, Brest et al. 2011).

Die in dieser Arbeit neu entwickelten murinen Dünndarmzellen zeigen starke Zell-Zell-Kontakte und eine ausgeprägte Expression des *tight junction* Proteins ZO-1 und des Zelladhäsionsmoleküls Ecadherin. Dadurch können die Zellen für Studien zum Transport oder verschiedene infektiöse Erreger, welche einen Einfluss auf die Barriere haben, untersucht werden. In dieser Arbeit wurden beispielhaft die Enterozyten-ähnlichen Zellen mit EPEC infiziert, um eine Auflösung der Zell-Zell-Kontakte über die Messung des TEERs nachzuverfolgen. Die Darstellung der veränderten Barriere erfolgte über die Anfärbung der ZO-1 Expression.

Für die möglichen Anwendungen Barriere-bildender Darmzellen ist besonders von Vorteil, dass die neu generierten Zelllinien besonders schnell und stabile Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Im Vergleich zu Caco-2, die 3 Wochen zur Ausbildung einer dichten Barriere und somit messbaren Widerstands benötigen, zeigen die immortalisierten intestinalen Darmzellen schon nach 3-4 Tagen einen sehr hohen Widerstand. Auch im Vergleich zu HT-29, die erst über eine längere Differenzierungsphase zu Enterozyten werden, ist eine deutlich schnellere Mucussekretion nach 1-2 Tagen im konfluenten Zustand vorteilhaft.

Die humane Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 aus dem Dickdarm zeigt einen undifferenzierten Phänotyp unter Standard-Wachstumsbedingungen. Sobald die Zellen für 21 Tage mit Forskolin kultiviert werden, bilden die Zellen einen Bürstensaum auf ihrer apikalen Seite (Ophir et al. 1995). Außerdem wurde gezeigt, dass Forskolin zur Expression von Muc2 führt und die Stimulation mit Natriumbutyrate die Enterozyten-spezifische Expression von alkaliner Phosphatase hervorbringt (Velcich et al. 1995).

Die Ausbildung des Bürstensaums kann durch Cytochalasin D gehemmt werden. Weiterhin induzieren Colchicine, Nocodazole und Taxol die Differenzierung und Apoptose in HT-29 Zellen (Banerjee et al. 1997, Eckert et al. 1997, Valenti et al. 1997). Die Differenzierung wurde über die Abflachung der Zellen, die Ausbildung des Bürstensaums auf apikaler Seite und die Entstehung von *tight junctions* zwischen benachbarten Zellen, charakterisiert (Anderson et al. 1993, Schneeberger & Lynch 1992). Apoptose wurde über die Ablösung runder Zellen aus der Zellschicht, Kondensation der nuklearen DNA und Annexin V Bindung an die Zelloberfläche nachgewiesen (Bonfoco et al. 1995, Bumbasirevic et al. 1995, Lindenboim et al. 1995). Außerdem wurde ein Subklon der Zellen durch Methotrexat-Behandlung etabliert, der reifen Gobletzellen ähnelt (HT-29-MTX) (Pontier et al. 2001). Typisch für HT-29-Zellen ist die Sekretion von Mucus. Zunächst wächst diese Zelllinie unpolarisiert, undifferenziert sowie mehrschichtig, wobei keine typischen Enterozyten-Marker nachgewiesen werden. Sobald die Zellen jedoch ca. 4 Wochen (30 Tage) Zeit zur Differenzierung hatten, zeigen die HT-29 Zellen Eigenschaften von Enterozyten (Zweibaum et al. 1985). Es werden dann ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte und Mikrovilli auf einem Bürstensaum beobachtet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diese humane Zelllinie aus dem Tumorgewebe in der Lage ist, zu differenzieren und besonders als Schleimproduzierende Zellen für die verschiedenen Anwendungen genutzt werden kann. Die in dieser Arbeit generierten immortalisierten Zellklone (I9K6, I9K10, I9K11) zeigen eine sehr starke Mucusproduktion wie mittels der Alcianblau-Färbung nachgewiesen wurde. Daher wurden die Zellen (I9K10) in einer Zusammenarbeit mit Horstmann et al. 2017 verwendet, wobei eine Salmonella-Infektion und deren Einflüsse auf die Mucusschicht sowie der Topologie der Zellen untersucht wurde (Horstmann et al. 2017).

Es wurde gezeigt, dass I9K10 als murine intestinale Epithelzelle, die eine Mucusproduktion aufweist, ähnlich wie die verwendete T84-Zelllinie (humaner Dickdarm) und E12-Zelllinie (Subklon von HT-29-MTX) von verschiedenen Salmonella-Mutanten invadiert wird. Dabei wird zwischen 2 Mutanten unterschieden, wobei eine Mutante einen Invasionsvorteil zeigt. Die Analyse der Beschaffenheit der Zelloberflächen ergab, dass I9K10 ebenso wie E12-Zellen zahlreiche Mikrovilli auf der Oberfläche besitzen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Flagella-vermittelte Invasionsphänotyp abhängig von der Topologie der Wirtszelloberfläche ist

und das die Anwesenheit der Mucusschicht nicht zu einer besseren Invasion bei der bevorteiligt-invadierenden *Salmonella*-Mutante führt.

Die humane Caco-2 Zelllinie ist ein akzeptiertes Modell, um Vorhersagen über die Permeabilität und Aufnahme von Medikamenten zu ermöglichen (Artursson & Karlsson 1991, Lennernas et al. 1996, Artursson et al. 2001; Keldenich 2009). Caco-2 Zellen zeigen Eigenschaften von Enterozyten wie z.B. *tight junctions*, eine apikale und basolaterale Ausrichtung der Zellen und einen Bürstensaum mit Mikrovilli auf der apikalen Oberfläche (Meunier et al. 1995). Sie teilen Charakteristika mit dem Dünndarmepithel wie Morphologie, Polarität und die Differenzierung in Enterozyten (Hidalgo et al. 1989). Es wurde berichtet, dass Caco-2 sehr genau die humane intestinale Permeabilität sowie Aufnahme von Verbindungen unabhängig vom transzellulären, parazellulären und Träger-vermittelten Transportmechanismus vorhersagt (Yee 1997). Nach 2-3 Wochen Differenzierung von Caco-2, werden TEER-Werte gemessen, die in der Literatur unterschiedliche Angaben liefern, wobei 1400-2400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ mit dem EVOM/Chopstick (Hilgendorf et al. 2000), 500-1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ mit dem EVOM/Endohm (Feighery et al. 2008), 250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ mit dem Millicell-ERS System (Béduneau et al. 2014) oder 3000-4000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ mit dem Voltage-Ohmmeter/Ag-Elektrode (Booth & Kim 2012) gemessen wurden.

Trotzdem weist dieses Modell einige kritische Limitierungen auf (Benet & Larregieu 2010, Yang et al. 2007). Caco-2 Zellen bestehen nur aus absorptiven Zellen bzw. Enterozyten, sodass die sekretorischen Zellen (Gobletzellen, enteroendokrine Zellen, M Zellen) bei diesem Modell nicht berücksichtigt werden (Hilgendorf et al. 2000). Außerdem zeigt das Caco-2 Modell andere Permeabilitäten von Verbindungen, die über Träger-vermittelte Absorption transportiert werden und eine Überexpression des P-Glycoproteins (Hilgendorf et al. 2000, Beduneau et al. 2014). Um das humane intestinale Epithel besser nachzubilden und somit die Limitierungen zu umgehen, wurde eine Co-Kultivierung mit anderen etablierten Zelllinien von Lozoya-Agullo et al. 2017 entwickelt. Dafür wurden HT-29-MTX Zellen und Raji B Zellen zur Co-Kultivierung mit Caco-2 genutzt (Antunes et al. 2013). Die Mucus-produzierende HT-29-MTX Zelllinie wird im Modell verwendet, um die Rolle des Schleims während der Medikamenten-Aufnahme zu verfolgen. Im Unterschied zu Caco-2 Zellen bilden die HT-29-MTX Zellen weniger und kürzere Mikrovilli aus, aber zeigen eine ähnliche Größe und zelluläre Komplexität (Pontier et al. 2001). Die Kultivierung von Caco-2 mit Raji B Lymphozyten führt dazu, dass Caco-2 einen Phänotyp von M Zellen ausbildet,

wobei der Bürstensaum, die Mikrovilli und typische Verdauungsfunktionen der Enterozyten verloren gehen (Lai & D'Souza 2008). M Zellen spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem und können Bestandteile wie Bakterien, Viren, Nanopartikel und Mikropartikel durch Endozytose transportieren (Des Rieux et al. 2007, Kadiyala I et al. 2010). In der Untersuchung von Lozoya-Agullo et al. 2017 wurden 12 Modell-Medikamente im Co-Kultivierungssystem untersucht und die Ergebnisse zeigten, dass dieses Modell eine vielversprechende Anwendungsmöglichkeit zur Vorhersage der intestinalen Permeabilität ist und die Medikamente somit in verschiedene Klassifikationen unterteilt werden können. Das neu entwickelte Co-Kultivierungssystem bildet somit den humanen Darm physiologisch nach und ist deshalb besser für weitere Studien geeignet als nur die Verwendung von Caco-2 Zellen.

Die hier generierten murinen intestinalen Dünndarmzellen können auch für Studien mit Co-Kultivierung verwendet werden, um beispielsweise die Interaktion mit Immunzellen sowie anderen Muskelzellen, die zur Darmperistaltik über Hormone wie beispielsweise Serotonin angeregt werden, genauer zu untersuchen. Für die Aufnahme von Medikamenten ist hauptsächlich der Dünndarm verantwortlich, sodass der Dickdarm nur eine untergeordnete Rolle dabei spielt (Lozoya-Agullo et al. 2015, Masaoka et al. 2006). Dies macht die neu generierten Zellen mittels CI-SCREEN-Technologie besonders interessant für die Untersuchung der Absorption von Medikamenten, da diese Zelllinien ihren Ursprung im murinen Dünndarm haben und verschiedenste Eigenschaften der unterschiedlichen Zellen zeigen ohne aus einem Tumor entstanden zu sein.

5. Ausblick

Die Daten, die in dieser Doktorarbeit generiert wurden, bieten die Basis für zahlreiche weiterführende Arbeiten. **(1)** Es konnte zwar in den bisher durchgeführten Arbeiten gezeigt werden, dass die neu immortalisierten Zelllinien die wesentlichen Marker und Funktionen der intestinalen Epithelzellen aufrechterhalten. Allerdings ist noch nicht hinreichend geklärt, um welchen Zelltyp es sich bei den einzelnen Klonen handelt. So soll mithilfe von weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob die Hypothese stimmt, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um die TA-Zellen handelt. Um die Einordnung der Zellen in die stammzellartigen Vorläuferzellen voranzubringen, könnten weitere Untersuchungen über die Expression spezifischer Marker erfolgen und über beispielsweise die Einbringung eines Lgr5-Promotors analysiert werden. Mithilfe eines Reportergens wie GFP könnte somit die Differenzierung der Zellen nachverfolgt werden.

(2) In dieser Doktorarbeit wurde bisher gezeigt, dass die Zellen unter definierten Bedingungen und ohne Beschichtung der Kultivierungsgefäße wachsen können, ohne ihre spezifischen Eigenschaften zu verlieren. Dennoch ist für einige Anwendungen die Nutzung möglichst terminal ausdifferenzierter Zellen essentiell. Aus diesem Grund kann das Medium mit verschiedenen Faktoren zur Differenzierung supplementiert werden und für verschiedene Anwendungen angepasst werden. Bereits in einer Studie von Yin et al. 2014 wurde für humane Dünndarm-Krypten der positive Effekt verschiedener Medienzusätze auf die Differenzierung in die unterschiedlichen Darmzellen herausgestellt. Somit kann über die Zugabe von Inhibitoren und Aktivatoren eine Differenzierung von Zellen induziert werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Zugabe von IWP-2 (Wnt-Inhibitor) und Valproinsäure (VPA) die Differenzierung in Richtung Enterozyten initiiert, da Valproinsäure die sekretorischen Zellen (Panethzellen, Enteroendokrine Zellen und Gobletzellen) reduziert. Sobald die Zellen eher in die sekretorische Richtung differenzieren sollen, muss DAPT als Notch-Inhibitor zur Kultivierung hinzugegeben werden. Panethzellen können vermehrt differenziert werden, sobald DAPT (Notch-Inhibitor) und CHIR (Wnt-Aktivator) hinzugefügt werden. Für Gobletzellen werden IWP-2 (Wnt-Inhibitor) und DAPT (Notch-Inhibitor) benötigt (Yin et al. 2014). Diese Ausdifferenzierung ist nur für bestimmte Zwecke hilfreich, da somit meist auch entscheidende Zelltypen reduziert werden. Dieser Ansatz kann auch auf die in dieser Arbeit immortalisierten Zelllinien

angewendet werden, um Zellsysteme zu erschaffen, welche den terminal differenzierten Zelltypen des Darms ähneln.

(3) Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der generierten intestinalen Darmzellen stellt die Erzeugung von *in vitro* Krankheitsmodellen dar. In diesem Zusammenhang kann vor allem die Krankheit CF genannt werden, da mithilfe der Crispr/Cas9-Technologie spezifische Modifikationen innerhalb des Genoms generiert werden können. Bei CF kommt es zur Mutation des CFTRs, der den ATP-abhängigen Chlorid-Kanal auf Epithelzellen reguliert (Cutting 2015). Der häufigste Defekt ist das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin an Position 508, sodass über Crispr Cas9 diese Aminosäure beispielsweise in I9K8 und I9K17 mutiert werden kann, um ein praktisches *in vitro* Modell zu erzeugen. Damit können dann neue potentielle Ziele für die Medikamentenentwicklung gefunden und der genaue Verlauf dieser Krankheit aufgeklärt werden.

(4) Darüber hinaus können mithilfe der immortalisierten Zelllinien komplexere Co-Kultivierungsmodelle aufgebaut werden. Dafür können neben den neu generierten Zelllinien beispielsweise Muskelzellen verwendet werden, die über Hormone wie z.B. Serotonin zur Darmperistaltik angeregt werden können. Außerdem können zur Co-Kultivierung auch Immunzellen genutzt werden und deren Zusammenspiel mit Darmzellen bei verschiedenen Infektionen mit Pathogenen oder der Beeinflussung des Immunsystems durch die Aufnahme chemischer Verbindungen über das Darmepithel (Medikamententestung) untersucht werden.

(5) Ein wesentlicher weiterer Ansatzpunkt ist die Übertragung der in dieser Arbeit gewonnenen Informationen bezüglich des Immortalisierungsprotokolls und der für die Immortalisierung benötigten Gene/Faktoren. Daher kann dieser Ansatz, der erfolgreich für murine Zellen verwendet wurde, auf Darmepithelzellen von anderen Säugerspezies und vor allem auch auf humane Zellen übertragen werden. Dafür kann als Grundlage die für das murine System indentifizierten Gene (Id2, Id3, Myc, Fos, E7, Rex, Nanog und Core) verwendet werden. Sobald eine solche Immortalisierung auch für humane Zellen etabliert wurde, kann die Technologie verwendet werden, um von verschiedenen Spendern oder Patienten, die an Krankheiten wie Morbus Crohn leiden, Zelllinien zu etablieren. Solche Patienten oder Krankheits-spezifische Zellsysteme wären ein weiterer Schritt in Richtung der Modellierung einer Krankheit in der Petrischale und bieten hervorragende Ansatzpunkte, um wirksame neuartige Medikamente zu identifizieren und optimieren.

6. Literatur

Abuznait AH & Kaddoumi A (2012). Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* **3**, 820-831.

Alexander PB, Yuan L, Yang P, Sun T, Chen R, Xiang H, Chen J, Wu H, Radloff DR & Wang XF (2015). EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence. *Cell Research* **25**, 135-138.

Allen KJ, Reyes R, Demmler K, Mercer JF, Williamson R & Whitehead RH (2000). Conditionally immortalized mouse hepatocytes for use in liver gene therapy. *J Gastroenterol Hepatol* **15**, 1325-1332.

Ambort D, Johansson MEV, Gustafsson JK, Nilsson HE, Ermund A, Johansson BR, Koeck PJB, Hebert H & Hansson GC (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *PNAS* **109**, 5645-5650.

Anderson JM, Balda MS & Fanning AS (1993). The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 772-778.

Anderson JM, Van Itallie CM (1995). *Tight junctions* and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **269**, G467–G475.

Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Wilkins SJ & Vulpe CD (2002). The expression and regulation of the iron transport molecules hephaestin and IREG: implications for the control of iron export from the small intestine. *Cell Biochem Biophys* **36**, 137-146.

Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, Refetoff S, Peremans K, Manto M, Kyba M & Costagliola S (2012). Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* **491**, 66-71.

Antunes F, Andrade F, Araujo F, Ferreira D & Sarmiento B (2013). Establishment of a triple co-culture *in vitro* cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm* **83**, 427-435.

Arda-Pirincci & Bolkent (2014). The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Histochemica* **116**, 167-175.

Artursson P (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. I: a model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* **79**, 476-482.

Artursson P & Karlsson J (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **175**, 880–885.

- Artursson P, Palm K & Luthman K (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Delivery Rev* **46**, 27-43.
- Ashcroft M & Vousden KH (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-7764.
- Assimakopoulos SF, Papageorgiou I & Charonis A (2011). Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol* **2**, 123-137.
- Ayabe T, Satcheö DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME & Ouellette AJ (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* **1**, 113-118.
- Babyatsky MW & Podolky DK (1991). Growth and development in the gastrointestinal tract. *Textbook of Gastroenterology*, 475-501.
- Badylak SF, Freytes DO & Gilbert TW (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta biomaterialia* **5**, 1-13.
- Balda MS & Matter K (2003). Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* **13**, 310-318.
- Bancroft AJ, McKenzie AN & Grencis RK (1998). A critical role for OL-13 in resistance to intestinal nematode infection. *J Immunol* **160**, 3453-3461.
- Banerjee S, Fallis AG & Brown DL (1997). Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. *Oncol Res* **9**, 237-248.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ & Clevers H (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007.
- Barker N & Clevers H (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* **138**, 1681-1696.
- Barker N (2014). Adult stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 19-33.
- Barnes D & Sato G (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* **22**, 649-655.
- Basith S, Manavalan B, Yoo TH, Kim SG & Choi S (2012). Roles of tolllike receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res* **35**, 1297-1316.
- Beduneau A, Tempesta C, Fimbel S, Pellequer Y, Jannin V, Demarne F & Lamprecht A (2014). A tunable Caco-2/HT29-MTX coculture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur J Pharm Biopharm* **87**, 290-298.

- Benet LZ & Larregieu CA (2010). The FDA should eliminate the ambiguities in the current BCS biowaiver guidance and make public the drugs for which BCS biowaivers have been granted. *Clin Pharmacol Ther* **88**,405–407.
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD & Hecht G (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the *tight junction* barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* **52**, 439–451.
- Bettes MD, Dubois N, Murphy MJ, Dubey C, Roger C, Robine S & Trumpp A (2005). C-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol* **25**, 7868-7878.
- Bevins CL & Salzman NH (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews* **9**, 356-368.
- Birchenough GMH, Johansson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH & Hansson GC (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology* **8**, 712-719.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdrop PM, DePinho RA & Greider CW (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.
- Blasi E, Mathieson BJ, Varesio L, Cleveland JL, Borchert PA & Rapp UR (1985). Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a raf/myc recombinant murine retrovirus. *Nature* **318**, 667-670.
- Blasi E, Radzioch D, Durum SK & Varesio L (1987). A murine macrophage cell line, immortalized by v-raf and v-myc oncogenes, exhibits normal macrophage functions. *Eur J Immunol* **17**, 1491-1498.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S & Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
- Bondow BJ, Faber ML, Woita KJ, Walker EM & Battle MA (2012). E-cadherin is required for intestinal morphogenesis in the mouse. *Dev Biol* **371**, 1-12.
- Bonfoco E, Ceccatelli S, Manzo L & Nicotera P (1995). Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res* **218**, 189-200.
- Booth R & Kim H (2012). Characterization of a microfluidic *in vitro* model of the blood-brain barrier (μBBB). *Lab Chip* **12**, 1784-1792.
- Bourgine J, Billaut-Laden I, Happillon M, Leo-Guidice JM, Maunoury V, Imbenotte M & Broly F (2012). Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug Metab Dispos* **40**, 694-705.

- Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier JF, Hébuterne X, Harel-Bellan A, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A & Hofman P (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* **43**, 242-245.
- Brown K, Valenta K, Fisman D, Simor A & Daheman N (2015). Hospital ward antibiotic prescribing and the risk of *Clostridium difficile* infection. *JAMA Intern Med* **175**, 626-633.
- Bumbasirevic V, Skaro-Milic A, Mircic A & Djuricic B (1995). Apoptosis induced by microtubule disrupting drugs in normal murine thymocytes *in vitro*. *Scanning Microsc* **9**, 509-516.
- Burkhardt DL & Sage J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* **8**, 671-682.
- Cao Y, Liu X, Zhang W, Deng X, Zhang H, Liu Y, Chen L, Thompson EA, Townsend CM & Ko TC (2009). TGF- β repression of Id2 induces apoptosis in gut epithelial cells. *Oncogene* **28**, 1089-1098.
- Carrell A (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* **15**, 516-528.
- Casburn-Jones AC (2004). Management of infectious diarrhea. *Gut* **53**, 296-305.
- Castro-Gamero AM, Borges KS, Lira RC, Andrade AF, Fedatto PF, Cruzeiro GA, Silva RB, Fontes AM, Valera ET, Bobola M, Scrideli CA & Tone LG (2013). Chromosomal heterogeneity and instability characterize pediatric medulloblastoma cell lines and affect neoplastic phenotype. *Cytotechnology* **65**, 871-885.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S & Smith A (2003). Functional expression cloning of Nanog a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655.
- Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L & Smith A (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230-1234.
- Chastre E, Di Gioia Y, Barbry P, Simon-Bouy B, Mornet E, Fanen P, Champigny G, Emami S & Gespach C (1991). Functional insertion of the SV40 large T oncogene in cystic fibrosis intestinal epithelium. Characterization of CFI-3 cells. *J Biol Chem* **266**, 21239-21246.
- Chen AC & Gudas LJ (1996). An analysis of retinoic acid- induced gene expression and metabolism in AB1 embryonic stem cells. *J Biol Chem* **271**, 14971-14980.
- Chen YL, Peng HC, Hsieh YC & Yang SC (2014). Epidermal growth factor improved alcohol-induced inflammation in rats. *Alcohol* **48**, 701-706.

- Cheng KC, Li C & Uss AS (2008). Prediction of oral drug absorption in humans– from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 581–590.
- Clevers H (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480.
- Clevers H & Nusse R (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-1205.
- Clevers H & Bevins CL (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol* **75**, 289-311.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C & Anderson JM (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C142-147.
- Colom A, Galgoczy R, Almendros I, Xaubet A, Farré R & Alcaraz J (2014). Oxygen diffusion and consumption in extracellular matrix gels: implications for designing three-dimensional cultures. *J Biomed Mater Res A* **102**, 2776-2784.
- Crane JK, McNamara BP & Sonnenberg MS (2001). Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**, 197-211.
- Crockett EK, Washburn KF, Graef JL, Lucas EA & Smith BJ (2017). MODE-K cells as a model to study the gut epithelial response: an outside-in and inside-out approach. *The FASEB Journal* **31**.
- Cutting GR (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* **16**, 45-56.
- Damia G & D'Incalci M (2010). Genetic instability influences drug response in cancer cells. *Curr Drug Targets* **10**, 1317-1324.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC & Li F (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* **16**, 253-264.
- Davies J & Davies D (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 417-433.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW & Wright GD (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**, 374-377.
- Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NWM, Bijvelds MJC, Scholte BJ, Nieuwenhuis EES, van den Brink S, Clevers H, van der Ent CK, Middendorp S & Beekman JM (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* **19**, 939-945.

- Dean DC (1989). Expression of the fibronectin gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1**, 5-10.
- De Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es JE, Guardavaccaro D, Schasfoort RB, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJ & Clevers H (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* **476**, 293-297.
- DeMarco VG, Li N, Thomas J, West CM & Neu J (2003). Glutamine and barrier function in cultured Caco-2 epithelial cell monolayers. *J Nutr* **133**, 2176-2179.
- Demeule M, Regina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A & Beliveau R (2002). Drug transport to the brain: Key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* **38**, 339-348.
- Des Rieux A, Fievez V, Theate I, Mast J, Preat V, Schneider YJ (2007). An improved *in vitro* model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. *Eur J Pharm Sci* **30**, 380-391.
- Drayton S & Peters G (2002). Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 98-104.
- Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, Sachs N, Overmeer RM, Offerhaus GJ, Begthel H, Korving J, van de Wetering M, Schwank G, Logtenberg M, Cuppen E, Snippert HJ, Medema JP, Kops GJ & Clevers H (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* **521**, 43-47.
- Duh G, Mouri N, Warburton D & Thomas DW (2000). EGF regulates early embryonic mouse gut development in chemically defined organ culture. *Pediatr Res* **48**, 794-802.
- Eckert K, Fuhrmann-Selter T & Maurer HR (1997). Docetaxel enhances the expression of E-cadherin and carcinoembryonic antigen (CEA) on human colon cancer cell lines *in vitro*. *Anticancer Res* **17**, 7-12.
- Eglen R & Resisine T (2011). Primary cells and stem cells in drug discovery: emerging tools for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* **9**, 108-124.
- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Sonnenberg MS & Kaper JB (1998). *Mol Microbiol* **28**, 1-4.
- Elliott SJ, Krejany EO, Mellies JL, Robins-Browne RM, Sasakawa C & Kaper JB (2001). EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **69**, 4027-4033.

- Emami S, Mir L, Gespach C & Rosselin G (1989). Transfection of fetal rat intestinal epithelial cells by viral oncogenes: establishment and characterization of the E1A-immortalized SLC-11 cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3194-3198.
- Engevik MA, Engevik KA, Yacyshyn MB, Wang J, Hassett DJ, Darien B, Yacyshyn BR & Worrell RT (2014). Human *Clostridium difficile* infection: inhibition of NHE3 and microbiota profile. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G497-G509.
- Engevik MA, Yacyshyn MB, Engevik KA, Wang J, Darien B, Hassett DJ, Yacyshyn BR & Worrell RT (2014). Human *Clostridium difficile* infection: altered mucus production and composition. *AM J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G510-G524.
- Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J & Giron JA (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 7426-7435.
- Evans MJ & Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA & Anderson JM (1998). The *tight junction protein* ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occluding and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**, 29745-29753.
- Fanning AS, Mitic LL & Anderson JM (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1337-1345.
- Farhadi A, Banan A, Fields J & Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* **18**, 479–497.
- Federico M (2003). Lentivirus Gene Engineering Protocols. *Humana Press*.
- Feighery LM, Cochrane SW, Quinn T, Baird AW, O'Toole D, Owens SE, O'Donoghue D, Mrsny RJ & Brayden DJ (2008). Myosin light chain kinase inhibition correction of increased intestinal epithelial permeability *in vitro*. *Pharm Res* **25**, 1377-1386.
- Finkbeiner SR, Zeng XL, Utama B, Atmar RL, Shroyer NF & Estes MK (2012). Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses. *mBio* **3**, e00159-12.
- Fogh J & Trempe G (1975). Human tumor cells *in vitro*. Boston, Springer US.
- Folkman J, Haudenschild CC & Zetter BR (1979). Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 5217-5221.
- Forbester JL, Goulding D, Vallier L, Hannan N, Hale C, Pickard D, Mukhopadhyay S & Dougan G (2015). Interaction of *Salmonella enterica* Erovar Typhimurium with intestinal organoids derived from human induced pluripotent stem cells. *Infect Immun* **83**, 2926-2934.

- Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Ettayebi K, Blutt SE, Hyser JM, Zeng XL, Crawford SE, Broughman JR, Estes MK & Donowitz M (2014). Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp Biol Med* **239**, 1124-1134.
- Foulke-Abel J, In J, Yin J, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Estes MK, de Jonge H & Donowitz M (2015). Human enteroids as a model of upper small intestinal ion transport physiology and pathophysiology. *Gastroenterology* **150**, 638-649.
- Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB & Knutton S (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**, 911-921.
- Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D & Artavanis-Tsakonas S (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**, 964-968.
- Freeman AE, Igel HJ, Herrman BJ & Kleinfeld KL (1976). Growth and characterization of human skin epithelial cell cultures. *In Vitro* **12**, 352-362.
- Freshney RJ (2010). Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized application. 6th Ed Wiley.
- Furness JB (2013). The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 729-740.
- Gadsby DC, Vergani P & Csanady L (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477-483.
- Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, Chong Y, Schüller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RW, Knutton S & Frankel G (2004). TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**, 1167-1183.
- Garner CD, Antonopoulos DA, Wagner B, Duhamel GE, Keresztes I, Ross DA, Young VB & Altier C (2009). Perturbation of the small intestine microbial ecology by streptomycin alters pathology in a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium murine model of infection. *Infect Immun* **77**, 2691-2702.
- Gazdar AF, Butel JS & Carbone M (2002). SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* **2**, 957-964.
- Gey GO, Coffman WD & Kubicek MT (1952). Tissue culture of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* **12**, 264-265.
- Goldbard S (2006). Bringing primary cells to mainstream drug development and drug testing. *Curr Opin Drug Discov & Devel* **9**, 110-116.

- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P & Jaramillo BE (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 1-44.
- Gossen M & Bujard H (1992). Tight control gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC & Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Hacker J & Kaper JB (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641-679.
- Hansen MB & Witte AB (2008). The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol (Oxf)* **193**, 311-323.
- Hansson GC (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol* **15**, 57-62.
- Hasskarl J & Munger K (2002). Id proteins-tumor markers of oncogenes? *Cancer Biol Ther* **1**, 91-96.
- Hauschka SD & Konigsberg IR (1966). The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc Natl Acad Sci USA* **55**, 119-126.
- Hayflick L & Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Hayashi H, Szászi K, Coady-Osberg N, Furuya W, Bretscher AP, Orlowski J & Grinstein S (2004). Inhibition and redistribution of NHE3, the apical Na⁺/H⁺ exchanger, by *Clostridium difficile* toxin B. *J Gen Physiol* **123**, 491-504.
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y & Li L (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* **36**, 1117-1121.
- He SM, Li R, Kanwar JR & Zhou SF (2011). Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem* **18**, 1117-1121.
- Hecht G, Marrero JA, Danilkovich A, Matkowskyj KA, Savkovic SD, Koutsouris A & Benya RV (1999). Pathogenic *Escherichia coli* increase Cl-secretion from intestinal epithelia by upregulating galanin-1 receptor expression. *J Clin Invest* **104**, 253-262.
- Hecht G, Hodges K, Gill RK, Kear F, Tyagi S, Malakooti J, Ramaswamy K & Dudeja PK (2004). Differential regulation of Na⁺/H⁺ exchange isoform activities by enteropathogenic *E. coli* in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G370-378.
- Heiskala M, Peterson PA & Yang Y (2001). The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* **2**, 93-98.

- Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, Augustin HG, Korff T (2015). Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis *in vitro*. *FASEB J* **29**, 3076-3084.
- Heng HH, Liu G, Stevens JB, Abdallah BY, Horne SD, Ye KJ, Bremer SW, Chowdhury SK & Ye CJ (2013). Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. *Cytogenet Genome Res* **139**, 144-157.
- Hermeking H & Eick D (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**, 2091-2093.
- Hidalgo IJ, Raub TJ & Borchardt RT (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736–749.
- Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regardh CG, Lipka E, Amidon GL & Langguth P (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX cocultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside carrier-mediated transport. *J Pharm Sci* **89**, 63-75.
- Hilgers AR, Conradi RA & Burton PS (1990). Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* **7**, 902-910.
- Hodges K & Gill R (2010). Infectious diarrhea cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes* **1**, 4-21.
- Hoffman J, Kuhnert F, Davis CR & Kuo CJ (2004). Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon. *Cell Cycle* **3**, 554-557.
- Hofmann C, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, Schoelmerich J, Rogler G & Grossmann J (2007). Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **132**, 587-600.
- Holmberg FE, Seidelin JB, Yin X, Mead BE, Tong Z, Li Y, Karp JM, Nielsen OH (2017). Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the treatment of inflammatory bowel disease. *EMBO Mol Med* **9**, 558-570.
- Holmes JL, Van Italie CM, Rasmussen JE & Anderson JM (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* **6**, 581-588.
- Hooper LV (2015). Epithelial cell contributions to intestinal immunity. *Adv Immunol* **126**, 129-172.
- Horrocks C, Halse R, Suzuki R & Shepherd R (2003). Human cell systems for drug discovery. *Curr Opin Drug Discov & Devel* **6**, 570-575.
- Horstmann JA, Zscheschang E, Truschel T, de Diego J, Lunelli M, Rohde M, May T, Strowig T, Stradal T, Kolbe M & Erhardt M (2017). Flagellin phase-dependent

swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive salmonella gut colonisation. *Cell Microbiol* **19**.

Hua G, Thin TH, Feldman R, Haimovitz-Friedman A, Clevers H, Fuks Z & Kolesnick R (2012). Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* **143**, 1266-1276.

Huet C, Sahuquillo-Merino C, Coudrier E & Louvard D (1987). Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol* **105**, 345-357.

Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY & Ingber DE (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* **328**, 1662-1668.

Hynes RO & Yamada KM (1982). Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* **95**, 369-377.

Hynes R (1985). Molecular biology of fibronectin. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 67-90.

In J, Foulke-Abel J, Zachos NC, Hansen AM, Kaper JB, Bernstein HD, Halushka M, Blutt S, Estes MK, Donowitz M & Kovbasnjuk O (2016). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* reduces mucus and intermicrovillar bridges in human stem cell-derived colonoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 48-62.

Istvanffy R & Oostendorp RA (2013). Generation and establishment of murine adherent cell lines. *Methods Mol Biol* **946**, 301-314.

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M & Tsukita S (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* **147**, 1351-1363.

Ivanovic Z (2009). Hypoxia or *in situ* normoxia: the stem cell paradigm. *J Cell Physiol* **219**, 271-275.

Jenkins C, Dallman TJ, Launder N, Willis C, Byrne L, Jorgensen F, Eppinger M, Adak GK, Aird H, Elviss N, Grant KA, Morgan D & McLauchlin J (2015). Public health investigation of two outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with consumption of watercress. *Appl Environ Microbiol* **81**, 3946-3952.

Jensen KB, Driskell RR & Watt FM (2010). Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis. *Nat Protoc* **5**, 898-911.

Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L & Hansson GC (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 15064-15069.

Johansson ME, Ambort D, Pelaseved T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, Subramani DB, Holmén-Larsson JM, Thomsson KA, Bergström JH, van der Post S,

- Rodriguez-Pineiro AM, Sjövall H, Bäckström M & Hansson GC (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3635-3641.
- Kadiyala I, Loo Y, Roy K, Rice J & Leong KW (2010). Transport of chitosan-DNA nanoparticles in human intestinal M-cell model versus normal intestinal enterocytes. *Eur J Pharm Sci* **39**, 103-109.
- Kaelin WG (1999). Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* **21**, 950-958.
- Kaur S, Vaishnavi P, Ray P, Singh M & Kochhar R (2014). Preliminary investigations on the effect of lactobacillus and epidermal growth factor on tight junction proteins in experimental *Clostridium difficile* infection. *AiM* **4**, 425-435.
- Kazanjian A, Noah T, Brown D, Burkart J & Shroyer NF (2010). Atonal homolog 1 is required for growth and differentiation effects of notch/gamma-secretase inhibitors on normal and cancerous intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **139**, 918-928.
- Keldenich J (2009). Measurement and prediction of oral absorption. *Chem Biodiversity* **6**, 2000-2013.
- Kenny B, Lai LC, Finlay BB & Sonnenberg MS (1996). EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**, 313-323.
- Kenny B & Finlay BB (1997). Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. *Infect Immun* **65**, 2528-2536.
- Kenny B & Jepson M (2000). Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* **2**, 579-590.
- Kibbey MC (1994). Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *J Tissue Cult Methods* **16**, 227-230.
- Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, Maeno Y, Doki Y, Inoue M, Monden T, Ando-Akatsuka Y, Furuse M, Tsukita S & Monden M (1997). Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol* **151**, 45-54.
- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA & Klingelutz AJ (1998). Botch Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-88.
- Klein F (2012). Eine innovative Strategie zur Etablierung physiologisch relevanter Säugerzelllinien. Doktorarbeit.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K & Martin GR (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188-6193.

- Kleinman HK, McGarvey ML, Hassettl JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW & Martin GR (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**, 312-318.
- Kleinman HK & Martin GR (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* **15**, 378-386.
- Klochender A, Weinberg-Corem N, Moran M, Swisa A, Pochet N, Savova V, Vikesa J, Van de Peer Y, Brandeis M, Regev A, Nielsen FC, Dor Y & Eden A (2012) A transgenic mouse marking live replicating cells reveals *in vivo* transcriptional program of proliferation. *Dev Cell* **23**, 681-690.
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G & Frankel G (1998). A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**, 2166-2176.
- Ko TC, Bresnahan WA & Thompson EA (1997). Intestinal cell cycle regulation. *Progress in Cell Cycle Research* **3**, 43-52.
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ & Clevers H (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-383.
- Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh S & Muro AF (1996). The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* **10**, 248-257.
- Kosher RA & Church RL (1975). Stimulation of *in vitro* somite chondrogenesis by procollagen and collagen. *Nature* **258**, 327-330.
- Koyanagi M, Takahashi J, Arakawa Y, Doi D, Fukuda H, Hayashi H, Narumiya S & Hashimoto N (2008). Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res* **86**, 270-280.
- Kretzschmar K & Clevers H (2016). Organoids: Modeling development and the stem cell niche in a dish. *Dev Cell* **38**, 590-600.
- Kretzschmar K & Watt FM (2012). Lineage tracing. *Cell* **148**, 33-45.
- Krukemeyer MG & Spiegel HU (2005). Chirurgische Forschung. *Thieme*, 80-82.
- Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA & Nusrat A (2001). Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* **159**, 2001-2009.
- Kuehn A, Kletting S, de Souza Carvalho-Wodarz C, Repnik U, Griffiths G, Fischer U, Meese E, Huwer H, Wirth D, May T, Schneider-Daum N & Lehr CM (2016). Human

alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *ALTEX* **33**, 251–260.

Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F & Ebner R (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* **9**, 273-285.

LaBarbera DV, Reid BG & Yoo BH (2012). The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **7**, 819-830.

Labat-Robert J, Bihari-Varga M & Robert L (1990). Extracellular matrix. *FEBS Lett* **268**, 386-393.

Lai YH & D'Souza MJ (2008). Microparticle transport in the human intestinal M cell model. *J Drug Targeting* **16**, 36-42.

Lajtha LG (1979). Stem cell concepts. *Differentiation* **14**, 23-34.

Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G & Keshay S (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* **125**, 47-57.

Langley RR, Fan D, Guo L, Zhang C, Lin Q, Brantley EC, McCarty JH & Fidler IJ (2009). Generation of an immortalized astrocyte cell line from H-2Kb-tsA58 mice to study the role of astrocytes in brain metastasis. *Int J Oncol* **35**, 665-672.

Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ & Darfeuille-Michaud A (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* **12**, 99-113.

Lapaquette P, Bringer MA & Darfeuille-Michaud A (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* **14**, 791-807.

Laquintana V, Trapani A, Denora N, Wang F, Gallo JM & Trapani G (2009). New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin Drug Deliv* **6**, 1017-1032.

Larregieu CA & Benet LZ (2013). Drug discovery and regulatory considerations for improving *in silico* and *in vitro* predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *AAPS J* **15**, 483-497.

Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y & Iavarone A (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signaling by Myc oncoproteins. *Nature* **407**, 592-598.

Lasorella A, Benezra R & Iavarone A (2014). The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat Rev Cancer* **14**, 77-91.

Lazebnik Y (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* **10**, 232-233.

- Le NT & Richardson DR (2002). Ferroportin 1: a new iron export molecule? *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 103-108.
- Lenfers K (2017). Entwicklung eines neuartigen funktionalen Testsystems aus murinen intestinalen Becherzelllinien. Masterarbeit,
- Lennernas H, Palm K, Fagerholm U & Artursson P (1996). Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells *in vitro* and human jejunum *in vivo*. *Int J Pharm* **127**, 103–107.
- Levin RJ (1994). Digestion and absorption of carbohydrates-from molecules and membranes to humans. *Am J Clin Nutr* **59**, 690S-698S.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW & Harley CB (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* **20**, 951-960.
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E & Zweibaum A (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* **50**, 6334-6343.
- Li N, De Marco VG, West CM & Neu J (2003). Glutamine supports recovery from loss of transepithelial resistance and increase of permeability induced by media change in Caco-2 cells. *J Nutr Biochem* **14**, 401-408.
- Li N & Neu J (2009). Glutamine deprivation alters intestinal *tight junctions* via a PI3-K/Akt mediated pathway in Caco-2 cells. *J Nutr* **139**, 710-714.
- Liberio MS, Sadowski MC, Soekmadji C, Davis RA & Nelson CC (2014). Differential effects of tissue culture coating substrates on prostate cancer cell adherence, morphology and behavior. *PLoS One* **9**, e112122
- Lillie JH, MacCallum DK & Jepsen A (1980). Fine structure of subcultivated stratified squamous epithelium grown on collagen rafts. *Exp Cell Res* **125**, 153-165.
- Lindenboim L, Haviv R & Stein R (1995). Inhibition of drug-induced apoptosis by survival factors in PC12 cells. *J Neurochem* **64**, 1054-1063.
- Linder S & Marshall H (1990). Immortalization of primary cells by DNA tumor viruses. *Exp Cell Res* **191**, 1-7.
- Ling MT, Wang X, Tsao SW & Wong YC (2002). Down-regulation of Id-1 expression is associated with TGF beta 1-induced growth arrest in prostate epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1570**, 145-152.
- Lipps C, May T, Hauser H & Wirth D (2013). Eternity and functionality – rational access to physiologically relevant cell lines. *Biol Chem* **394**, 1637-1648.
- Lipps C, Klein F, Wahlicht T, Seiffert V, Butueva M, Zauers J, Truschel T, Luckner M, Koester M, MacLeod R, Petzold J, Huehn J, Yuan Q, Müller PP, Kempf H, Zweigerdt

- R, Dittrich-Breiholz O, Pufe T, Beckmann R, Drescher W, Riancho J, Sanudo C, Korff T, Opalka B, Rebmann V, Göthert JR, Alves PM, Ott M, Schucht R, Hauser H, Wirth D & May T (2017). Expansion of functional, personalized cells with specific transgene combinations. *Nature* (in Revision)
- Liu X, Roberts J, Dakic A, Zhang Y & Schlegel R (2008). HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology* **375**, 611-623.
- Liu B & Pop M (2009). ARDB-Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res* **37**, D443-447.
- Loiola RA, Torres TC, Aburaya CM, Landgraf MA, Landgraf RG, Bosco Pesquero J & Fernandes L (2013). Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation. *Exp Cell Res* **319**, 1102-1110.
- Lozoya-Agullo I, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Merino-Sanjuan M & Bermejo M (2015). *In situ* perfusion model in rat colon for drug absorption studies: Comparison with small intestine and Caco-2-cell model. *J Pharm Sci* **104**, 3136-3145.
- Lu Z, Ding L, Lu Q & Chen YH (2013). Claudins in intestines: Distributions and functional significance in health and disease. *Tissue Barriers* **1**.
- Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N & Mody RK (2014). Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect* **142**, 2270-2280.
- Lutolf MP & Hubbell JA (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* **23**, 47-55.
- Machida I, Wakusawa S, Sanae F, Hayashi H, Kusakabe A, Ninomiya H, Yano M & Yoshioka K (2005). Mutational analysis of the MRP2 gene and long-term follow-up of Dubin-Johnson syndrome in Japan. *J Gastroenterol* **40**, 366-370.
- Macklis JD, Sidman RL & Shine HD (1985). Cross-linked collagen surface for cell culture that is stable, uniform, and optically superior to conventional surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol* **21**, 189-194.
- Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 7634-7638.
- Martinez F (2012). *Clostridium difficile* outbreaks: prevention and treatment strategies. *Risk Manag Healthc Policy* **5**, 55-64.
- Masaoka Y, Tanaka Y, Kataoka M, Sakuma S & Yamashita S (2006). Site of drug absorption after oral administration assessment of membrane permeability and luminal

concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur J Pharm Sci* **29**, 240-250.

Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T & Sato T (2015). Modeling colorectal cancer using CRIPR/Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* **21**, 256-262.

May T, Hauser H & Wirth D (2004). Transcriptional control of SV40 T-antigen expression allows a complete reversion of immortalization. *Nucleic Acids Res* **32**, 5529-5538.

May T, Butueva M, Bantner S, Markusic D, Seppen J, MacLeod RA, Weich H, Hauser H & Wirth D (2010). Synthetic gene regulation circuits for control of cell expansion. *Tissue Eng Part A* **16**, 441-452.

May T, Hauser H & Wirth D (2012). Funktionale Zelllinien durch neue Immortalisierungsprotokolle. *BIOspektrum*, 390-393.

McCracken KW, Howell JC, Wells JM & Spence JR (2011). Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells *in vitro*. *Nat Protoc* **6**, 1920-1928.

McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrède JP, Donnenberg MS & Hecht G (2001). Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* **107**, 621-629.

Meier S & Hay ED (1974). Control of corneal differentiation by extracellular materials. Collagen as a promoter and stabilizer of epithelial stroma production. *Dev Biol* **38**, 249-270.

Meunier V, Bourrie M, Berger Y & Fabre G (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* **11**, 187-194.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M & Yamanaka S (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-642.

Montesano R, Schaller G & Orci L (1991). Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors. *Cell* **66**, 697-711.

Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM & Giannella RA (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**, 1340-1351.

Moran ET (1985). Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. *J Nutr* **115**, 665-674.

- Moran GW, Leslie FC, Levison SE, Worthington J & McLaughlin JT (2008). Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? *Therap Adv Gastroenterol* **1**, 51-60.
- Moran AP, Gupta A & Joshi L (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* **60**, 1412–1425.
- Morgan EH & Oates PS (2002). Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* **29**, 384-399.
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 771-785.
- Mowat AM & Agace WW (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* **14**, 667-685.
- Muncan V, Sansom OJ, Tertoolen L, Phesse TJ, Begthel H, Sancho E, Cole AM, Gregorieff A, de Alboran IM, Clevers H & Clarke AR (2006). Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* **26**, 8418-8426.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M & Huh K (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**, 11451-11460.
- Murphree AL & Benedict WF (1984). Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* **223**, 1028-1033
- Navarro-Garcia F (2014). *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiol Spectr* **2**, 533-539.
- Nicholas CR & Kriegstein AR (2010). Regenerative medicine: cell reprogramming gets direct. *Nature* **463**, 1031-1032.
- Noah TK, Donahue B & Shroyer NF (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp Cell Res* **317**, 2702-2710.
- Norman A, Hansen LH & Sorensen SJ (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 2275-2289.
- Nguyen HTT, Dalmasso G, Müller S, Carrière J, Seibold F & Darfeuille-Michaud A (2014). Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* **146**, 508-519.
- Ophir I, Cohen E & Ben-Shaul Y (1995). Apical polarity in human colon carcinoma cell lines. *Tissue & Cell* **27**, 659-666.

- Oren M (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **274**, 36031-36034.
- Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T & Swarm R (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exper Med* **145**, 204-224.
- Oulette AJ (2010). Paneth cells and innate mucosal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* **26**, 547-553.
- Page AL, Ciglenecki I, Jasmin ER, Desvignes L, Grandesso F, Polonsky J, Nicholas S, Alberti KP, Porten K & Luguero FJ (2015). Geographic distribution and mortality risk factors during the cholera outbreak in a rural region of Haiti, 2010-2011. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003605.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodriguez-pineiro AM, Nyström EE, Wising C, Johansson ME & Hansson GC (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* **260**, 8-20.
- Pelengaris S, Khan M & Evan G (2002). C-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* **2**, 764-776.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H & Clevers H (2003). Canonical Wnt-signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17**, 1709-1713.
- Pipas JM (2009). SV40: cell transformation and tumorigenesis. *Virology* **384**, 294-303.
- Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B & Arnaud P (2001). HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci* **90**, 1608-1619.
- Potten CS, Kovacs L & Hamilton E (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet* **7**, 271-283.
- Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A & Weinberg RA (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* **6**, 171-183.
- Rheinwald JG & Green H (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-343.
- Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, Pellegrinet L, van Es JH, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Honio T, Clevers H & Radtke F (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch 1 and Notch 2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep* **9**, 377-383.

- Richler C & Yaffe D (1970). The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol* **23**, 1-22.
- Rogoz A, Reis BS, Karssemeijer RA, Mucida D (2015). A 3-D enteroid-based model to study T-cell and epithelial cell interaction. *J Immunol* **421**, 89-95.
- Roig AI, Eskiocak U, Hight SK, Kim SB, Delgado O, Souza RF, Spechler SJ, Wright WE & Shay JW (2010). Immortalized epithelial cells derived from human colon biopsies express stem cell markers and differentiate *in vitro*. *Gastroenterology* **138**, 1012-1021.
- Romero-Lanman EE, Pavlovic S, Amlani B, Chin Y & Benezra R (2012). Id1 maintains embryonic stem cell self-renewal by up-regulation of Nanog and repression of Barchyury expression. *Stem Cells Dev* **21**, 384-393.
- Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD & Finlay BB (1996). A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* **15**, 2613-2624.
- Russell WM & Burch RL (1959). Principles of Humane Experimental Technique.
- Russell RG, Lasorella A, Dettin LE & Iavarone A (2004). Id2 drives differentiation and suppresses tumor formation in the intestinal epithelium. *Cancer Res* **64**, 7220-7225.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ & Clevers H (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262-265.
- Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* **141**, 1762-1772.
- Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shrover NF, van de Wetering M, Clevers H (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415-418.
- Sattler CA, Michalopoulos G, Sattler GL & Pitot HC (1978). Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Res* **38**, 1539-1549.
- Savkovic SD, Koutsouris A & Hecht G (1996). Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun* **64**, 4480-4487.
- Savkovic SD, Koutsouris A & Hecht G (1997). Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* **273**, C1160-1167.
- Savkovic SD, Villanueva J, Turner JR, Matkowskyj KA & Hecht G (2005). Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection *Infect Immun* **73**, 1161-1170.

- Saxena K, Blutt SE, Ettayebi K, Zeng XL, Broughman JR, Crawford SE, Karandikar UC, Sastri NP, Conner ME, Opekun AR, Graham DY, Qureshi W, Sherman V, Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Donowitz M & Estes MK (2016). Human intestinal enteroids: a new model to study human rotavirus infection, host restriction, and pathophysiology. *J Virol* **90**, 43-56.
- Schepers AG, Vries R, van den Born M, van de Wetering M & Clevers H (2011). Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J* **30**, 1104-1109.
- Schneeberger EE & Lynch RD (1992). Structure and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* **262**, L647-L661.
- Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM & Clevers H (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* **13**, 653-658.
- Schwerk J, Köster M, Hauser H, Rohde M, Fulde m, Hornef MW & May T (2013). Generation of mouse small intestinal epithelial cell lines that allow the analysis of specific innate immune functions. *PLoS One* **8**, e72700.
- Scotland KB, Chen S, Sylvester R & Gudas LJ (2009). Analysis of Rex1 (Zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Dev Dyn* **238**, 1863-1877.
- Simonovic I, Rosenberg J, Koutsouris A & Hecht G (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol* **2**, 305-315.
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG & Kassem M (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* **20**, 592-596.
- Sinagoga KL & Wells JM (2015). Generating human intestinal tissues from pluripotent stem cells to study development and disease. *EMBO J* **34**, 1149-1163.
- Sipos F, Firneisz G & Muzes G (2016). Therapeutic aspects of c-Myc signaling in inflammatory and cancerous colonic diseases. *World J Gastroenterol* **22**, 7938-7950.
- Snippert HJ & Clevers H (2011). Tracking adult stem cells. *EMBO Rep* **12**, 113-122.
- Soeters PB, Luyer MD, Greve JW & Buurman WA (2007). The significance of bowel permeability. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**, 632-638.
- Sompayrac LM (2015). How the immune system works. 5th Edition, Wiley-Blackwell.
- Sonna LA, Cullivan ML, Sheldon HK, Pratt RE & Lilly CM (2003). Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). *Physiol Genom* **12**, 195-207.

- Sottile J & Mosher DF (1993). Assembly of fibronectin molecules with mutations or deletions of the carboxyl-terminal type I modules. *Biochemistry* **32**, 1641-1647.
- Speckmann EJ, Enke A & Wittkowski W (2006). Bau und Funktion des menschlichen Körpers: Praxisorientierte Anatomie und Physiologie. 20. Aufl München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar M, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF & Wells JM (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* **470**, 105-109.
- Spitz J, Yuhan R, Koutsouris A, Blatt C, Alverdy J & Hecht G (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *Am J Physiol* **268**, G374-379.
- Stacey G & MacDonald (2001). Immortalisation of primary cells. *Cell Biol Toxicol* **17**, 231-246.
- Stallmach A, Häuser W, L'hoest H & Marschall U (2012). Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa: Herausforderungen an die Versorgung. *BARMER GEK: Gesundheitswesen aktuell 2012*, 286-309.
- Stanger BZ, Datar R, Murtaugh LC & Melton DA (2005). Direct regulation of intestinal fate by Notch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12443-12448.
- Steenwinckel V, Louahed J, Lemaire MM, Sommereyns C, Warnier G, McKenzie A, Brombacher F, Van Snick J & Renauld JC (2009). IL-9 promotes IL-13-dependent Paneth cell hyperplasia and up-regulation of innate immunity mediators in intestinal mucosa. *J Immunol* **182**, 4737-4743.
- Sternini C, Anselmi L & Rozengurt E (2008). Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **15**, 73-78.
- Stevens JB, Horne SD, Abdallah BY, Ye CJ & Heng HH (2013). Chromosomal instability and transcriptome dynamics in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **32**, 391-402.
- Strauss M & Griffin BE (1990). Cellular immortalization – an essential step or merely a risk factor in DNA virus-induced transformation? *Cancer Cells* **2**, 360-365.
- Sun D, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, Fleisher D, Lee KD & Amidon GL (2002). Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm Res* **19**, 1400-1416.
- Suzuki K, Fukui H, Kayahara T, Sawada M, Seno H, Hiai H, Kageyama R, Okano H & Chiba T (2005). Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 348-352.

- Tegtmeyer P, Schwartz M, Collins JK & Rundell K (1975). Regulation of tumor antigen synthesis by Simian virus 40 gene. *A J Virol* **16**, 168-178.
- Tetteh PW, Basak O, Farin HF, Wiebrands K, Kretzschmar K, Begthel H, van den Born M, Korving J, de Sauvage F, van Es JH, van Oudenaarden A & Clevers H (2016). Replacement of lost Lgr5-positive stem cells through plasticity of their enterocyte-lineage daughters. *Cell Stem Cell* **18**, 203-213.
- Thiagarajah JR, Donowitz M & Verkman AS (2015). Secretory diarrhea: mechanisms and emerging therapies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 446-457
- Thomas JT, Canelos P, Luyten FP & Moos JM (2009). Xenopus SMOC-1 inhibits bone morphogenetic protein signaling downstream of receptor binding and is essential for postgastrulation development in Xenopus. *J Biol Chem* **284**, 18994-19005.
- Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD & de Sauvage FJ (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* **478**, 255-259.
- Todaro GJ & Green H (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**, 299-313.
- Todaro GJ & Green H (1965). Successive transformations of an established cell line by polyoma virus and Sv40. *Science* **147**, 513-514.
- Traggiai E (2012). Immortalization of human B cells: analysis of B cell repertoire and production of human monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol* **901**, 161-170.
- Tsukita S & Furuse M (1999). Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* **9**, 268–73.
- Tu X, Nisan I, Yona C, Hanski E & Rosenshine I (2003). EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **47**, 595-606.
- Valenti AM, Niero A, Monti G, Marangolo F & Marangolo M (1997). Paclitaxel and N-methylformamide: *in vitro* interactions in human colon cancer cell lines. *Anticancer Res* **17**, 2491-2497.
- Van Amerongen R & Nusse R (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205-3214.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**.
- VanDussen KL, Marinshaw JM, Shaikh N, Miyoshi H, Moon C, Tarr PI, Ciorba MA & Stappenbeck TS (2015). Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. *Gut* **64**, 911-920.

- Van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F & Clevers H (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-963.
- Van Es JH, de Geest N, van de Born M, Clevers H & Hassan BA (2010). Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nat Commun* **1**, 18.
- Van Itallie C, Rahner C & Anderson JM (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* **107**, 1319-1327.
- Vass-Marengo J, Ratiarson A, Asselin C & Bastin M (1986). Ability of a T-antigen transport defective mutant of simian virus 40 to immortalize primary cells and to complement polyomavirus middle T in tumorigenesis. *J Virol* **59**, 655-659.
- Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisie C, Racevskis J & Augenlicht L (1995). Patterns of expression of lineage-specific markers during the *in vitro*-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth & Differ* **6**, 749-757.
- Verhoeckx K & Cotter P (2015). The impact of food bioactives on gut health: *In vitro* and *ex vivo* models. Cham und [Brussels, Belgium]: SpringerOpen.
- Vidal K, Grosjean I, evillard JP, Gespach C & Kaiserlian D (1993). Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods* **166**, 63-73.
- Votteler M, Kluger PJ, Walles H & Schenke-Layland K (2010). Stem cell microenvironments—unveiling the secret of how stem cell fate is defined. *Macromol Biosci* **10**, 1302-1315.
- Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS & Roberts AB (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* **202**, 1-8.
- Walia B, Castaneda FE, Wang L, Kolachala VL, Bajaj R, Roman J, Merlin D, Gewirtz AT & Sitaraman SV (2004). Polarized fibronectin secretion induced by adenosine regulates bacterial-epithelial interaction in human intestinal epithelial cells. *Biochem J* **382**, 589-596.
- Wang W, Uzzau S, Goldblum SE & Fasano A (2000). Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* **113**, 4435-4440.
- Wang GG, Calvo KR, Pasillas MP, Sykes DB, Hacker H & Kamps MP (2006). Quantitative production of macrophages of neutrophils *ex vivo* using conditional Hoxb8. *Nat Methods* **3**, 287-293.

- Wang HJ, Li MQ, Liu W, Yao GD, Xia MY, Hayashi T, Fujisaki H, Hattori S, Tashiro S, Onodera S & Ikejima T (2016). Gelatin promotes murine fibrosarcoma L929 cell detachment and protects the cells from TNF α -induced cytotoxicity. *Connect Tissue Res* **57**, 262-269.
- Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E & McDonald LC (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* **366**, 1079-1084.
- Watson CL, Mahe MM, Múnera J, Howell JC, Sundaram N, Poling HM, Schweitzer JI, Vallance JE, Mayhew CN, Sun Y, Grabowski G, Finkbeiner SR, Spence JR, Shroyer NF, Wells JM & Helmrath MA (2014). An *in vivo* model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* **20**, 1310-1314.
- Watt FM & Hogan BL (2008). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-1430.
- Wells JM & Spence JR (2014). How to make an intestine. *Development* **141**, 752-760.
- Wenger RH (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* **16**, 1151-1162.
- Westerman KA & Leboulch P (1996). Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8971-8976.
- Westfall SD, Sachdev S, Das P, Hearne LB, Hannink M, Roberts RM & Ezashi T (2008). Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* **17**, 869-881.
- White JF (2003). Intestinal pathophysiology in autism. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 639-49.
- Wikenheiser KA, Vorbroker DK, Rice WR, Clark JC, Bachurski CJ, Oie HK & Whitsett JA (1993). Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/Simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11029-11033.
- Williams SD, Risau W, Zerwes HG, Drexler H, Aguzzi A & Wagner EF (1989). Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell* **57**, 1053-1063.
- Willing BP, Russell SL & Finlay BB (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol* **9**, 233-243.

Wittchen ES, Haskins J & Stevenson BR (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* **274**, 35179–35185.

Wright EM, Martin MG & Turk E (2003). Intestinal absorption in health and disease-sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**, 943-956.

Wu HL, Wang Y, Zhang P, Li SF, Chen X, Chen YK, Li JG, Yang SM, Su YP, Wang JP & Chen B (2011). Reversible immortalization of rat pancreatic beta cells with a novel immortalizing and tamoxifen-mediated self-recombination tricistronic vector. *J Biotechnol* **151**, 231-241.

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD & Carpenter MK (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**, 971-974.

Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, Su N, Luo Y, Heilshorn SC, Amieva MR, Sangiorgi E, Capecchi MR & Kuo CJ (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 466-471.

Yan KS, Janda CY, Chang J, Zheng GXY, Larkin KA, Luca VC, Chia LA, Mah AT, Han A, Terry JM, Ootani A, Roelf K, Lee M, Yuan J, Li X, Bolen CR, Wilhelmy J, Davies PS, Ueno H, von Furstenberg RJ, Belgrader P, Ziraldo SB, Ordonez H, Henning SJ, Wong MH, Snyder MP, Weissman IL, Hsueh AJ, Mikkelsen TS, Garcia KC & Kuo CJ (2017). Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem-self-renewal. *Nature* **545**, 238-242.

Yanai N, Suzuki M & Obinata M (1991). Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive Simian virus 40 large T-antigen gene. *Exp Cell Res* **197**, 50-56.

Yang NS, Kube D, Park C & Furmanski P (1981). Growth of human mammary epithelial cells on collagen gel surfaces. *Cancer Res* **41**, 4093-4100.

Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ & Zoghbi HY (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**, 2155-2158.

Yang J, Nagavarapu U, Relloma K, Sjaastad MD, Moss WC, Passaniti A & Herron GS (2001). Telomerized human microvasculature is functional in vivo. *Nat Biotechnol* **19**, 219-224.

Yang Y, Faustino PJ, Volpe DA, Ellison CD, Lyon RC & Yu LX (2007). Biopharmaceutics classification of selected beta-blockers: solubility and permeability class membership. *Mol Pharmaceutics* **4**, 608–614.

Yee S (1997). *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm Res* **14**, 763–766.

Yin Y, Bijvelds M, Dang W, Xu L, van der Eijk AA, Knipping K, Tuysuz N, Dekkers JF, Wang Y, de Jonge J, Sprengers D, van der Laan LJ, Beekman JM, Ten Berge D, Metselaar HJ, de Jonge H, Koopmans MP, Peppelenbosch MP & Pan Q (2015). Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids. *Antiviral Res* **123**, 120-131.

Ying QL, Nichols J, Chambers I & Smith A (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292.

Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H & Watanabe M (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult LGR5+ stem cell. *Nat Med* **18**, 618-623.

Zecchini V, Domaschenz R, Winton D & Jones P (2005). Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes Dev* **19**, 1686-1691.

Zhang N, Yantiss RK, Nam HS, Chin Y, Zhou XK, Scherl EJ, Bosworth BP, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ & Benezra R (2014). ID1 is a functional marker for intestinal stem and progenitor cells required for normal response to injury. *Stem Cell Reports* **3**, 716-724.

Zhou K, Koike C, Yoshida T, Okabe M, Fathy M, Kyo S, Kiyono T, Saito S & Nikaido T (2013). Establishment and characterization of immortalized human amniotic epithelial cells. *Cell Reprogram* **15**, 55-67.

Zhu Y, Huang YF, Kek C & Bulavin DV (2013). Apoptosis differently affects lineage tracing of Lgr5 and Bmi1 intestinal stem cell populations. *Cell Stem Cell* **12**, 298-303.

Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL & Rousset M (1985). Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J Cell Physiol* **122**, 21-29.

